

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Regulación transcripcional de la inflamación en macrófagos por el Receptor X de Retinoides

**Daniel Alameda Serrano
Licenciado en Biología y Bioquímica**

**Tesis doctoral dirigida por la Dra. Mercedes Ricote Pacheco
Tutor: Dr. Miguel Ángel Íñiguez Peña**

CNIC, Madrid, 2014

RESUMEN

Los receptores nucleares forman una superfamilia de factores de transcripción activados por ligando. Entre ellos, destaca el receptor X de retinoides (RXR), que heterodimeriza con la mayoría de receptores no esteroideos. Estos receptores están implicados en la patogénesis de enfermedades como la diabetes, la aterosclerosis o la respuesta autoinmune, a través del control del metabolismo lipídico y la inflamación en macrófagos. RXR se ha descrito como un compañero silencioso de estos receptores en el heterodímero. Por ello, existen pocos estudios que hayan explorado el papel de RXR en funciones biológicas como el control de la respuesta inmune. Los resultados presentados en el presente trabajo muestran que los homodímeros y heterodímeros de RXR activados por retinoides son capaces de controlar distintas etapas de la respuesta inflamatoria en macrófagos.

Los homodímeros de RXR α regulan la respuesta inflamatoria del macrófago, mediante el control de la transcripción de las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9*. El descenso de estas quimioquinas en ratones deficientes en RXR α en células mieloides se correlaciona con una menor migración leucocitaria. Además, la ausencia de RXR α en macrófagos tiene un impacto positivo en la supervivencia de estos ratones a sepsis. Ello sugiere que RXR α favorece el establecimiento de la respuesta inflamatoria exacerbada que contribuye a la muerte del organismo en esta patología. RXR α también interviene en la resolución de la inflamación junto con PPAR γ , regulando la expresión de genes que favorecen la fagocitosis de partículas apoptóticas. La captura de estas partículas promueve la adquisición del fenotipo anti-inflamatorio en el macrófago mediante un mecanismo dependiente de RXR α y PPAR γ . En este contexto, RXR α regula negativamente la expresión de genes pro-inflamatorios en respuesta a las partículas apoptóticas. Esta represión transcripcional podría estar mediada por un mecanismo de transrepresión a través de homodímeros de RXR α , como sugieren los estudios *in vitro*. Sin embargo, los análisis de expresión diferencial y ChIP-Seq en macrófagos primarios muestran que, en estas células, el mecanismo de transrepresión de RXR se produce a través del heterodímero permisivo RXR/PPAR γ . Ambos receptores son necesarios para la transrepresión de genes pro-inflamatorios mediada por sus ligandos. RXR también es esencial para la transrepresión mediante LXR, aunque el heterodímero RXR/LXR no es permisivo en transrepresión. En conjunto, estos resultados sugieren que RXR participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y que su actividad puede modularse mediante retinoides. Esto abre la posibilidad del uso de ligandos de RXR para el tratamiento de enfermedades de origen inflamatorio como la diabetes, la sepsis o la aterosclerosis.

ABSTRACT

Nuclear receptors are a superfamily of ligand activated transcription factors. Retinoid X receptor (RXR) is a central nuclear receptor because it heterodimerizes with most of non-steroid receptors. These receptors are implicated in the pathogenesis of diseases, such as the diabetes, atherosclerosis, or autoimmune response, through the control of lipid metabolism or inflammation in macrophages. RXR has been described as a silent partner for these receptors in the heterodimer. This is the reason why there are just few studies exploring the role of RXR in biological functions like the control of the immune response. The results presented in this work show that rexinoid activated RXR homodimers and heterodimers are capable of controlling inflammatory response in macrophages at different stages.

RXR α homodimers regulate macrophages inflammatory response by the transcriptional control of the chemokines *Cc/6* and *Cc/9*. The decrease of these chemokines in mice lacking RXR α in myeloid cells correlates with low leukocyte migration. Furthermore, absence of RXR α in macrophages has a positive impact in sepsis survival in these mice. This suggests that RXR α favours the onset of an exacerbated inflammatory response which contributes to the organism death in this pathology. RXR α along with PPAR γ also participates in the control of inflammation resolution phase, by regulating the expression of genes related to apoptotic particles phagocytosis in macrophages. The engulfment of these particles favours the anti-inflammatory phenotype acquisition by the macrophage through a RXR α and PPAR γ dependent mechanism. In this context, RXR α was observed to negatively regulate pro-inflammatory gene expression in response to apoptotic particles. This transcriptional repression could be mediated by a transrepression mechanism through RXR α homodimers as suggested by *in vitro* studies. However, differential expression and ChIP-Seq analysis in primary macrophages show that RXR transrepression mechanism is mediated by RXR/PPAR γ permissive heterodimers in these cells. Both receptors are required for pro-inflammatory genes transrepression mediated by their ligands. RXR is also essential for LXR mediated transrepression, although RXR/LXR heterodimer response to ligands is not permissive in transrepression. Together, these results suggest that RXR participates actively in the regulation of the inflammatory response and its activity can be modulated by rexinoids. This opens up the possibility for the use of RXR ligands for the treatment of inflammatory diseases such as diabetes, sepsis or atherosclerosis.

ÍNDICE:**I. LISTADO DE ABREVIATURAS**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La superfamilia de los receptores nucleares	3
1.1.1. Clasificación	3
1.1.2. Estructura	4
• Región A/B	4
• Dominio de unión al ADN (DBD)	5
• Región bisagra	5
• Dominio de unión a ligando (LBD)	5
1.1.3. Elementos de respuesta a hormonas (HRE)	5
1.1.4. Ligandos	6
1.1.5. Correguladores	8
1.1.6. Regulación transcripcional	9
• Transactivación dependiente de ligando	9
• Represión independiente de ligando	9
• Represión dependiente de ligando	9
• Transrepresión dependiente de ligando	10
1.2. El Receptor X de Retinoides (RXR)	11
1.2.1. Ligandos de RXR	12
1.2.2. Dimerización de RXR	12
1.2.3. Localización genómica de RXR	15
1.2.4. RXR en el tratamiento de enfermedades	15
1.3. Sistema inmune innato	17
1.3.1. Componente celular	17
1.3.2. Componente humoral	18
• Sistema del complemento	18
• Opsoninas	18
• Citoquinas	18
1.4. Inflamación	19
1.4.1. Sepsis	21
1.4.2. Receptores <i>Toll-like</i> y la regulación del factor de transcripción NFκB	21
1.5. Macrófagos	22
1.5.1. Activación clásica y alternativa del macrófago	22
1.5.2. Los macrófagos en patologías metabólicas e inflamatorias	23
1.5.3. Los receptores nucleares en las funciones de los macrófago	24

2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Reactivos	33
3.2. Plásmidos	33
3.3. Animales	33
3.4. Cultivo celular	34
3.5. Análisis de ARN	35
3.6. Southern blot y análisis de ADN por PCR	35
3.7. Tarjetas microfluídicas	36
3.8. Estudio de expresión génica por microarray	36
3.9. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa	36
3.10. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	37
3.11. Western blot	37
3.12. Inmunoprecipitación de cromatina y análisis de ChIP-Seq	37
3.13. Preparación de librerías para secuenciación	38
3.14. Análisis de datos de secuenciación	38
3.15. Medida de nitritos y prostaglandina E ₂	39
3.16. Preparación de timocitos apoptóticos	39
3.17. Citometría de flujo y cuantificación de citoquinas	39
3.18. Ensayos de migración celular	40
3.19. Ensayos de transmigración endotelial	40
3.20. Modelos murinos de inflamación aguda	40
3.21. Modelo de edema en la oreja de ratón	41
3.22. Estadística	41
4. RESULTADOS	43
4.1. RXR α modula la respuesta inflamatoria mediante el control de la expresión de quimioquinas y genes relacionados con la fagocitosis en macrófagos	45
4.1.1. RXR α regula la expresión de las quimioquinas <i>Ccl6</i> y <i>Ccl9</i> como homodímero	47
4.1.2. Los macrófagos no requieren de PPAR γ para expresar <i>Ccl6</i> y <i>Ccl9</i> y regular la migración leucocitaria	51
4.1.3. Los macrófagos RXR α KO conservan la sensibilidad a estímulos quimioatrayentes como CCL6 y CCL9	53
4.1.4. La ausencia de RXR α en macrófagos incrementa la supervivencia de ratones en modelos de sepsis	55

4.1.5. La ausencia de RXR α o PPAR γ reduce la respuesta anti-inflamatoria de los macrófagos en presencia de células apoptóticas	57
4.1.6. Las células apoptóticas estimulan la expresión de genes relacionados con la fagocitosis mediante un mecanismo dependiente de RXR α y PPAR γ	60
4.2. RXR reprime la respuesta inflamatoria mediante el mecanismo de transrepresión.....	63
4.2.1. Los ligandos de RXR inhiben la inducción de genes pro-inflamatorios en macrófagos.....	65
4.2.2. El tratamiento con LG268 reprime genes diana de PPAR γ y LXR ..	66
4.2.2. El tratamiento con LG268 reprime genes diana de PPAR γ y LXR ..	67
4.2.3. RXR inhibe la transcripción de genes pro-inflamatorios en ausencia de PPAR γ y LXR.....	69
4.2.4. Los homodímeros de RXR α transreprimen la actividad de NF κ B ..	72
4.2.5. La transrepresión mediada por RXR α es independiente de coactivadores.....	75
4.2.6. RXR transreprime por un mecanismo dependiente de PPAR γ en macrófagos peritoneales	76
4.2.7. PPAR γ y LXR dependen de RXR en transrepresión	80
4.2.8. Efecto anti-inflamatorio de 9cis-RA en un modelo murino de dermatitis.....	83
5. DISCUSIÓN	85
5.1. Control de la expresión de quimioquinas relevantes en el inicio del proceso inflamatorio por homodímeros de RXR α	88
5.2. RXR α y la respuesta del organismo a la sepsis	90
5.3. La resolución de la inflamación en macrófagos inducida por partículas apoptóticas a través de RXR α y PPAR γ	91
5.4. Efecto represor de la inflamación del tratamiento con rexinoides	92
5.5. Características del mecanismo de transrepresión de los homodímeros de RXR α	94
5.6. Permisividad del mecanismo de transrepresión dependiente de RXR y PPAR γ	96
5.7. Co-localización de RXR y PPAR γ en loci p65 que regulan a los genes reprimidos por rexinoides	98
5.8. Perspectivas de futuro de RXR en la terapia anti-inflamatoria	100
6. CONCLUSIONES.....	103

7. BIBLIOGRAFÍA	107
8. ANEXO	133
I. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los experimentos ...	135
II. Fórmulas de los tampones empleados en los experimentos de ChIP	135
II. Fórmulas de los tampones empleados en los experimentos de ChIP	136
III. Publicaciones	137

I. LISTADO DE ABREVIATURAS

36B4, Arbp, *acidic ribosomal phosphoprotein P0*

9cis-RA, ácido 9-*cis*-retinoico

ABCA1, *ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1*

ADN-ChIP, ADN obtenido mediante ChIP

AF-1, función de activación 1 o función de activación independiente de ligando

AF-2, función de activación 2 o función de activación dependiente de ligando

AP-1, proteína activadora 1

APL, leucemia aguda promielocítica

AR, NR3C4, receptor de andrógenos

ARN, ARN mensajero

AT, *apoptotic thymocytes*, timocitos apoptóticos

BM- MΦ, macrófagos derivados de medula ósea

CBP, proteína de unión a CREB

CD36, receptor *scavenger*: gen diana de PPAR γ

cDNA, DNA complementario

Células NK, células *Natural Killer*

ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*, Inmunoprecipitación de cromatina

ChIP-Seq, inmunoprecipitación de cromatina acoplados con secuenciación masiva

CLP, ligación y punción del apéndice

CoRNR, correpresor de receptor nuclear

COX2, ciclooxigenasa-2

Cre, enzima Cre-recombinasa

Ct, ciclo umbral

Ctrl, Control

DBD, *DNA Binding Domain*, dominio de unión al DNA

DR, repeticiones directas

DSG, disuccinimidil glutamato

ELISA, *enzyme-linked immunoabsorbent assay*

EMSA, ensayo de cambio en la movilidad electroforética

ER, Repeticiones evertidas

ER α , NR3A1, receptor de estrógenos alfa

ER β , NR3A2, receptor de estrógenos beta

FACS, clasificación de células activadas por fluorescencia

FBS, suero fetal bovino

FCGR1, receptor de Fc γ I
FDR, *false discovery rate*
Floxed, flanqueado por secuencias *lox*
FXR, NR1H4, receptor X de farnesoides
GO: *Gene Ontology*
GR, NR3C1, receptor de glucocorticoides
GW647, GW7647, ligandos específico para PPAR α
GW742, GW0742, ligandos específico para PPAR δ
HAT, histona acetiltransferasa
HRE, elementos de respuesta a hormona
HUVEC, células endoteliales de la vena del cordón umbilical
ICAM3, molécula de adhesión intercelular 3
IFN, interferón
IL, interleuquina
IR, Repeticiones invertidas
KLA, lípido A Kdo-2
KO, *Knock-out*
LBD, *Ligand Binding Domain*, dominio de unión al ligando
LBP, *Ligand binding pocket*, bolsillo de unión a ligando
LDL, *Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de baja densidad
LG268, LG100268, agonista de RXR
LG269, LG100269, bexaroteno, Targetin, agonista de RXR
LG754, LG100754, agonista en RAR/RXR y PPAR/RXR, antagonista de RXR/RXR
Lpl, lipoproteína lipasa
LPS, lipopolisacárido
LRP1, receptor de lipoproteínas de baja afinidad
LXR α , NR1H3, receptor X del hígado alfa
LXR β , NR1H2, receptor X del hígado beta
LysCre, Cre-recombinasa con el promotor del gen de la Lisozima M
M1, macrófago con fenotipo pro-inflamatorio
M2, macrófago con fenotipo anti-inflamatorio
MCP1, proteína quimiotáctica de monocitos 1
MERTK, receptor tirosina quinasa c-mer
MIP1 α , proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
MR, NR3C2, receptor de mineralocorticoides
NCoR, correpresor de receptores nucleares

NFkB, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*

NO, óxido nítrico

NOS, especies reactivas de nitrógeno

NOS2, óxido nítrico sintasa inducible

OxLDL, lipoproteína de baja densidad oxidada

PBS, *phosphate buffered saline*

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PGE₂, prostaglandina E₂

PPAR α , NR1C1, receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa

PPAR β/δ , NR1C2, receptor activado por proliferadores peroxisomales delta

PPAR γ , NR1C3, receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma

PR, NR3C3, receptor de progesterona

PtdSer, fosfatidilserina

PTGS2, ciclooxigenasa-2

PXR, NR1I2, receptor X de pregnanos

PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

qPCR, PCR cuantitativa o PCR a tiempo real

RAR, receptor de ácido retinoico

RAR α , NR1B1, receptor de ácido retinoico alfa

RAR β , NR1B3, receptor de ácido retinoico beta

RAR γ , NR1B3, receptor de ácido retinoico gamma

RNA-Seq, secuenciación masiva de ARN mensajero

ROS, especies reactivas de oxígeno

Rosiglitazone, rosiglitazone

RT, retrotranscripción

RXR, receptor X de retinoides

RXR α , NR2B1, receptor X de retinoides alfa

RXR β , NR2B2, receptor X de retinoides beta

RXR γ , NR2B3, receptor X de retinoides gamma

SMRT Mediador de silenciamiento de los receptores de hormonas tiroideas y retinoicos

SD, desviación Standard

SRC1, corregulador del receptor esteroideo

T1317, T0901317, agonista de LXR

TBL1, proteína transducina β -like 1

TBLR1, proteína relacionada con TBL 1

TG, tioglicolato
TGM2, transglutaminasa 2
TG-MΦ, macrófagos aislados empleando tioglicolato
TGF, factor de crecimiento transformante
TLR, receptores *Toll-like*
TNF, factor de necrosis tumoral
TPA, acetato 12-O-tetradecanoilforbol
TR, receptor de hormonas tiroideas
TR α , NR1A1, receptor de hormonas tiroideas alfa
TR β , NR1A2, receptor de hormonas tiroideas beta
TSS, sitio de inicio de la transcripción
TTNPB, agonista específico de RAR
VDR, NR1H1, receptor de vitamina D
WT, *wild type*
XCT0135908, agonista de RXR/Nurr1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La superfamilia de los receptores nucleares

Los receptores nucleares (RN) forman una superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando. Estos receptores regulan la expresión de genes implicados en diversos procesos fisiológicos como la reproducción, el desarrollo, el metabolismo o la respuesta inmune¹⁻³. El primer RN descrito fue identificado bioquímicamente en los años 60⁴. Elwood V. Jensen y colaboradores mostraron que el estradiol es retenido específicamente en células del aparato reproductor femenino, donde queda unido con alta afinidad a una proteína receptora intracelular. De este modo, las hormonas ejercen su efecto fisiológico sobre sus tejidos diana. En los años 80 se clonaron los primeros RN, entre ellos el receptor de estrógenos (ER, NR3A1-2), el receptor de glucocorticoides (GR, NR3C1) y el receptor de hormonas tiroideas (TR, NR1A1-2) en los laboratorios del Pierre Chambon, Ron M. Evans y Björn Vennström respectivamente⁵⁻⁸. A partir de entonces, más de 20 RN han sido aislados y, a partir de la secuenciación del genoma, se han identificado un total de 48 RN humanos y 49 murinos.

1.1.1. Clasificación

Los RN se clasifican filogenéticamente en 6 subfamilias según la similitud de sus secuencias⁹. Cuando los RN se fueron descubriendo, recibieron nombres triviales según sus características funcionales. Para dar lógica a esta nomenclatura de la superfamilia se adoptó un sistema de números y códigos que se utiliza junto con la nomenclatura tradicional^{10,11}. El estudio de las funciones de los RN ha dado lugar recientemente a una clasificación de estos según su patrón de expresión en diferentes tejidos, observándose que ciertos RN se expresan coordinadamente en tejidos con funciones fisiológicas comunes¹². Otra clasificación funcional ampliamente extendida se basa en las propiedades de unión a ligando de los RN y los divide en tres grupos según sus propiedades de unión al ligando (Figura I-1). El grupo de los receptores endocrinos lo forman receptores que tienen alta afinidad por sustancias lipofílicas, como hormonas y vitaminas. Este grupo incluye a los receptores esteroideos (ER, receptor de andrógenos, receptor de progesterona, receptor de mineralocorticoides y GR) y los no esteroideos: el receptor del ácido retinoico (RAR, NR1B1-3), el receptor de la vitamina D (VDR, NR1I1) y TR. El resto de RN se reparten en dos grupos formados por receptores no esteroideos. Aquellos receptores para los que se desconoce el ligando natural se denominan receptores huérfanos. Cuando el ligando es identificado estos receptores pasan al grupo de los receptores huérfanos adoptados (Figura I-1). Los receptores huérfanos adoptados forman un grupo de receptores que

se unen con baja afinidad a productos del metabolismo lipídico cuya liberación no está regulada de manera directa por el organismo a diferencia de las hormonas endocrinas.

Receptores Endocrinos		Receptores Huérfanos Adoptados		Receptores Huérfanos	
ER α, β	Estrógenos	RXR α, β, γ	9-cisRA, DHA, PUFA	Nurr1	?
PR	Progesterona	PPAR α, β, γ	Prostanoides, FA	EAR2	?
AR	Andrógenos	LXR α, β	Oxisteroles	SHP	?
GR	Glucocorticoides	FXR	Ácidos Biliares	TLX	?
MR	Mineralocorticoides	PXR/SXR	Xenobióticos	PNR	?
		CAR	Xenobióticos	NOR1	?
RAR α, β	Ácido Retinoico	SF-1	Fosfolípidos	DAX-1	?
TR α, β, γ	Hormona tiroidea	LRH-1	Fosfolípidos	ERR α, β, γ	?
VDR	Vitamina D	Nur77	Citosporona B	GCNF	?
		ROR α, β, γ	Oxisteroles	TR2,4	?
		RVR α, β, γ	Grupo hemo		
		HNF-4	Ácido linoleico		
		COUP-TF α, β, γ	Ácido retinoico		

Fig I-1. Clasificación de la superfamilia de los receptores nucleares por su unión a ligando. Adaptado de Burris et al., Pharmacol. Rev., 2013

1.1.2. Estructura

Los RN comparten una estructura modular que consiste en 6 dominios homólogos en secuencia y función. Los dominios se denominan con las letras A-F desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal (Figura I-2)^{13,14}. La estructura general de un RN se compone de una región muy variable N-terminal (región A/B), un dominio de unión a ADN (DBD) muy conservado (región C), una región bisagra (región D), y un dominio de unión a ligando (LBD) muy conservado entre los RN (región E). La región F en el extremo C-terminal no está presente en todos los RN, y su función no está completamente definida (Figura I-2). La estructura en módulos de los RN ha permitido el estudio de sus funciones. Se han generado receptores deficientes en funciones concretas mediante la delección de ciertos dominios o por la mutagénesis de ciertos residuos. El empleo de estos mutantes también ha permitido analizar la relación de los receptores con ciertos factores con los que interaccionan.

- Región A/B

Es una región poco definida que contiene una función de transactivación denominada función de activación 1 (AF-1), y que puede actuar de forma dependiente o independiente de la unión del ligando.

- Dominio de unión al ADN (DBD)

El DBD se encuentra en la región C, en la zona central de los RN. Este dominio está muy conservado y confiere la habilidad de reconocer secuencias específicas de ADN. Su estructura consiste en un núcleo de 66 residuos que contiene dos motivos de dedos de cinc, dos hélices α y una extensión C-terminal que incluye las cajas T y A. El reconocimiento de la secuencia específica de ADN tiene lugar en una región del primer dedo de cinc denominado caja P^{9,15}. El DBD también está involucrado en la dimerización a través de residuos muy conservados en la caja D. Esta región determina la separación entre las dos secuencias que reconocen los dímeros de RN.

- Región bisagra

La región bisagra o región D se corresponde con un dominio poco conservado que sirve de unión flexible entre el DBD y el LBD.

- Dominio de unión a ligando (LBD)

El LBD se encuentra poco conservado y se halla en la región E. Este dominio incluye muchas de las estructuras que caracterizan a cada RN. Incluye cuatro superficies relacionadas funcionalmente: una superficie de dimerización, que media la interacción con los LBD de

otros receptores; el bolsillo de unión a ligando (LBP), al que se unen partículas hidrofóbicas que actúan como ligando; una superficie de unión a correguladores, al que se unen proteínas reguladoras que modulan la actividad transcripcional; y el dominio de activación AF-2 (hélice 12), que media la transactivación dependiente de ligando. Cuando el ligando se une al LBP, se producen interacciones alostéricas esenciales para la actividad del receptor, que afectan a todas estas estructuras.

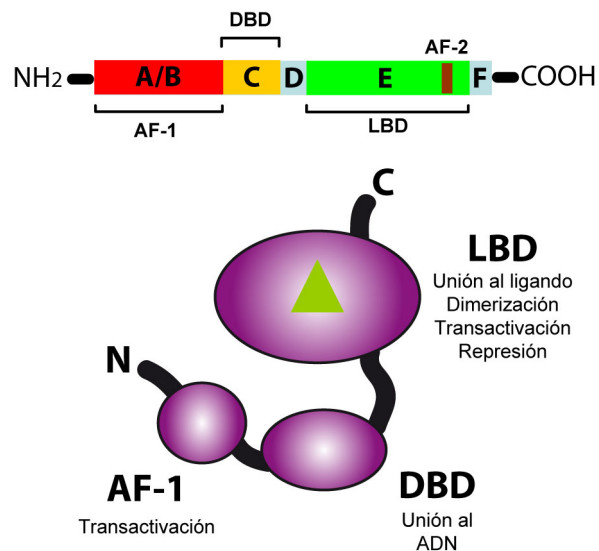


Fig 1-2. Estructura general de los receptores nucleares. DBD, Dominio de unión al ADN; LBD, dominio de unión al ligando.

1.1.3. Elementos de respuesta a hormonas (HRE)

Los RN regulan la transcripción uniéndose al ADN en secuencias específicas denominadas HRE, localizadas en la proximidad de los genes diana. Clásicamente se ha analizado la función de los RN en los HRE presentes en el promotor proximal del gen, ya que allí es donde se une la maquinaria de transcripción. Sin embargo las

nuevas tecnologías en secuenciación masiva han permitido la identificación de nuevos HRE, localizados en intensificadores alejados corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, o en los intrones de los genes a los que regulan. Recientemente, se han obtenido las primeras evidencias de mecanismos de regulación de RN en los que están implicados ncRNAs que se producen en HRE localizados en zonas del genoma alejadas del promotor proximal de los genes¹⁶⁻¹⁸. Los HRE están compuestos por dos motivos hexaméricos. Estos motivos están separados por un espaciador compuesto por un número reducido de nucleótidos, y pueden estar dispuestos en repeticiones directas (DRs), invertidas (IR) o evertidas (ER). Las diferentes orientaciones de las secuencias repetidas determinan la selectividad de cada RN por un HRE^{3,19}.

Un gran número de receptores no esteroideos forman heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR, NR2B1-3). Estos receptores se unen generalmente a DRs, compuestos por dos motivos con la secuencia consenso 5'-AGGTCA-3' separados por un número variable de nucleótidos. Esta característica fue descrita como la regla del 1-2-3-4-5, porque los motivos pueden estar separados de 1 a 5 nucleótidos formando los elementos DR-1 a DR-5²⁰. Los nucleótidos que rodean al HRE y los que forman el espaciador también tienen un papel en la interacción con el receptor²¹. Pueden encontrarse HRE con secuencias muy degeneradas respecto a la consenso, pero individualmente estas secuencias están bien conservadas entre especies, lo que apoya que sean funcionales²². La estructura de RXR es única, porque no sólo le permite unirse a diferentes HRE cuando heterodimeriza con otros receptores, también hace posible la formación de homodímeros que se une a elementos DR-1²³. RXR se une a elementos DR-1 cuando forma heterodímero con el receptor activado por proliferadores peroxisomales α (PPAR α , NR1C1), PPAR δ (NR1C2), o PPAR γ (NR1C3), y también se une a sitios DR-4 cuando el compañero de heterodímero es el receptor X hepático α (LXR α , NR1H3) o LXR β (NR1H2).

1.1.4. Ligandos

Los ligandos de los RN son moléculas hidrofóbicas, liposolubles y de pequeño tamaño que se unen con afinidades variables al LBP. Por su naturaleza hidrofóbica los ligandos de RN atraviesan la membrana celular sin necesidad de proteínas transportadoras. Según su naturaleza existen ligandos esteroideos y no esteroideos^{24,25}. Los ligandos esteroideos son hormonas secretadas por las gónadas o las glándulas suprarrenales, y actúan de manera endocrina en el control de la homeostasis, el desarrollo y otras funciones fisiológicas importantes. Entre ellos, se incluyen los estrógenos, la progesterona, los mineralocorticoides, los glucocorticoides, los andrógenos o la ecdisterona²⁶. Los ligandos no esteroideos forman un grupo

heterogéneo de moléculas, que incluye a los ácidos retinoicos, la vitamina D₃, la hormona tiroidea, xenobióticos, lípidos de la dieta o sustratos, intermediarios o productos del metabolismo lipídico (ácidos biliares, ácidos grasos, eicosanoides y oxisteroles)²⁶. Algunos receptores no esteroideos, como PPAR o LXR, actúan como sensores de lípidos y regulan su metabolismo en la célula²⁶. Por ejemplo, LXR responde a oxisteroles generados durante el metabolismo del colesterol, activando la expresión de genes que controlan el transporte, catabolismo y eliminación de este lípido²⁷.

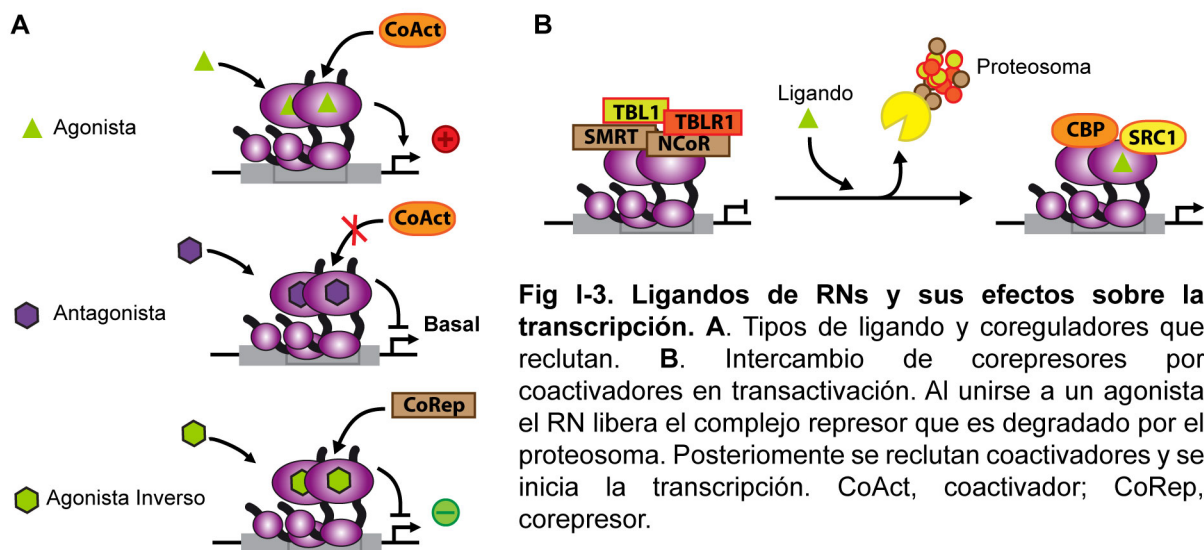


Fig I-3. Ligandos de RNs y sus efectos sobre la transcripción. A. Tipos de ligando y coreguladores que reclutan. **B.** Intercambio de corepresores por coactivadores en transactivación. Al unirse a un agonista el RN libera el complejo represor que es degradado por el proteosoma. Posteriormente se reclutan coactivadores y se inicia la transcripción. CoAct, coactivador; CoRep, corepresor.

La respuesta transcripcional que provoca la unión del ligando al RN se produce mediante cambios conformacionales en el LBD, que estabilizan la unión del receptor al ADN y promueven interacciones con coactivadores o corepresores^{28,29}. Los ligandos que favorecen una conformación activa del RN se denominan agonistas. La reubicación de la hélice 12 del dominio AF-2 en el LBD en respuesta a estos ligandos favorece el inicio de la transcripción. Aquellos ligandos que bloquean al RN en una conformación inactiva se denominan antagonistas (Figura I-3A)²⁸. También existen ligandos agonistas de un RN y antagonistas de otro³⁰⁻³². Los antagonistas se unen al LBP pero, al contrario que los agonistas, estabilizan la hélice 12 en una posición inactiva impidiendo que se establezca la zona de interacción con coactivadores. Los coactivadores y corepresores comparten parcialmente la misma zona de interacción en el receptor, que incluye residuos de la hélice 12. Por ello, es posible que el receptor, unido al antagonista, tampoco permita la unión a corepresores y sólo se silencie la actividad del RN sin reprimir la expresión basal del gen (Figura I-3A)^{25,28}. Existen otros ligandos denominados agonistas inversos, que estabilizan la unión del corepresor, lo que no sólo silencia el efecto de los agonistas, sino que también

provoca la inhibición de la expresión basal de los genes diana del receptor (Figura I-3A)^{25,28}.

El estudio de la estructura de los ligandos ha permitido el diseño de agonistas y antagonistas sintéticos con gran afinidad por sus receptores. Además, se han obtenido ligandos que permiten modular funciones concretas del receptor. De esta manera, se puede conseguir el efecto terapéutico asociado a ciertas funciones, evitando los efectos secundarios provocados por el resto de actividades del receptor²⁸.

1.1.5. Correguladores

Los correguladores son proteínas con actividad enzimática que se unen a factores de transcripción para activar o reprimir la transcripción de genes específicos a través de cambios en la estructura de la cromatina³³⁻³⁶. Algunas de ellas hacen a su vez de plataforma de unión para otros correguladores. Según promuevan la transcripción o la inhiban, los correguladores se denominan coactivadores o correpresores respectivamente.

Muchos RN y otros factores de transcripción comparten los mismos coactivadores³⁷. Algunos coactivadores, como la proteína de unión a CREB (CBP), p300 o el corregulador del receptor esteroideo (SRC1), tienen actividad histona acetiltransferasa (HAT) que causa la relajación de la cromatina por la acetilación de las histonas. Esta actividad favorece la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a la zona promotora del gen y promueve su expresión²⁵. Los complejos correpresores, como el correpresor de RN (NCoR), suelen contener enzimas con actividad histona desacetilasa. Estas enzimas eliminan grupos acetilo de las lisinas de las histonas, incrementando así la carga positiva de estas proteínas, por lo que adquieren mayor afinidad por el ADN, impidiendo así el acceso de cualquier factor regulador de la transcripción a la zona promotora del gen²⁵.

La unión del ligando al RN provoca un cambio conformacional que genera una nueva superficie de interacción en el LBD, que es reconocida por los coactivadores³⁶. Un motivo helicoidal presente en los coactivadores, como el SRC1, es el responsable de establecer contacto con el receptor. Este motivo contiene la secuencia consenso LXXLL, que encaja en un bolsillo formado por la hélice 12 y el LBD^{38,39}. Los correpresores, como NCoR y el mediador de silenciamiento de los receptores de hormona tiroideas y retinoicos (SMRT), están unidos a RAR y TR en ausencia de ligando³⁶ y se unen con receptores esteroideos en respuesta a sus antagonistas. Estos correpresores contienen un motivo con la secuencia consenso LXX I/H IXXX I/L o una caja de correpresor de receptor nuclear (CoRNR)⁴⁰⁻⁴², que se unen a una zona que solapa parcialmente con el lugar de unión de los coactivadores. Por ello, el movimiento

de la hélice 12 en respuesta a ligando cambia la estructura de este bolsillo desfavoreciendo la interacción con correpresores, que son sustituidos por coactivadores, que tienen mayor afinidad por la nueva superficie de interacción. En el caso de NCoR, la unión al ligando promueve su degradación a través del reclutamiento de la maquinaria de ubiquitinación que lo marca para su reconocimiento por el proteosoma (Figura I-3B)⁴³.

1.1.6. Regulación transcripcional

Los RN pueden regular positiva o negativamente la transcripción de un gen mediante distintos mecanismos en ausencia o presencia de ligando (Figura I-4).

- Transactivación dependiente de ligando

Los RN activados por sus ligandos se unen a HRE, presentes en el promotor o intensificador de sus genes diana, y reclutan a los coactivadores. Estos coactivadores favorecen la unión de la maquinaria de transcripción, en la que se incluye la ARN polimerasa II que inicia la expresión del gen (Figura I-4A)^{44,45}.

- Represión independiente de ligando

Algunos RN, como RAR o TR, se encuentran unidos a correpresores en ausencia de ligando. La presencia de correpresores mantiene reprimidos los promotores en los que se encuentran unidos estos receptores, ya que la unión de la maquinaria de transcripción está desfavorecida⁴⁶. Cuando se produce la unión al ligando, el RN pierde afinidad por los correpresores y recluta coactivadores que favorecen la transcripción (Figura I-4B).

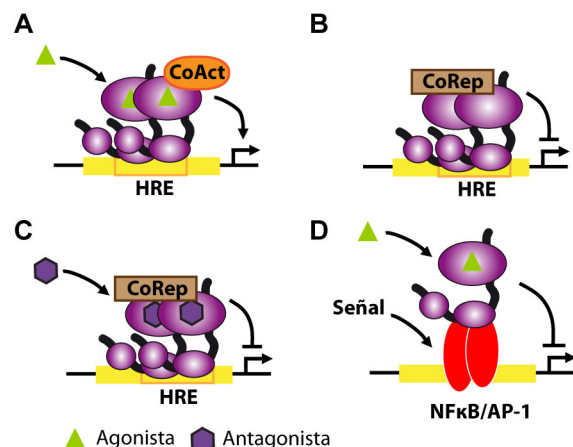


Fig I-4. Mecanismos de regulación de la transcripción de los RNs. A. Transactivación dependiente de ligando. B. Represión independiente de ligando. C. Represión dependiente de ligando. D. Transrepresión dependiente de ligando. CoAct, coactivador; CoRep, corepresor.

- Represión dependiente de ligando

La unión de ciertos ligandos antagonistas promueven una estructura del RN incompatible con la unión a coactivadores. Además, estos antagonistas pueden promover el reclutamiento de correpresores, y reprimir así la expresión de los genes diana del RN, que se une a los HRE específicos en el promotor de estos (Figura I-4C)^{47,48}.

- Transrepresión dependiente de ligando

Muchos RN, como GR, ER, PPAR γ o LXR, pueden interferir en la señalización de otros factores de transcripción inhibiendo la expresión de sus genes diana. Este mecanismo denominado transrepresión se produce sobre factores como NF κ B (*Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) o AP-1 (*activator protein-1*), se activan por estímulos externos y están relacionados con la respuesta inflamatoria. La transrepresión es dependiente de ligando y se caracteriza porque el RN no se une directamente al ADN (Figura I-4D). Se han propuesto diversos mecanismos de transrepresión, de modo que un mismo RN puede reprimir la expresión mediante más de un mecanismo (Figura I-5)⁴⁹.

Uno de los primeros mecanismos de transrepresión que se describieron consiste en la competición entre RN y NF κ B o AP-1 por los mismos coactivadores. El reclutamiento de los coactivadores por parte de los RN activados reduce la disponibilidad de estos, provocando una disminución de la tasa de transcripción de los genes diana de NF κ B o AP-1, que necesitan estos coactivadores para inducir la transcripción (Figura I-5A). Este modelo de competición fue descrito inicialmente para RAR y GR⁵⁰, aunque posteriormente se demostró que no se cumple en el caso de GR⁵¹. El principal

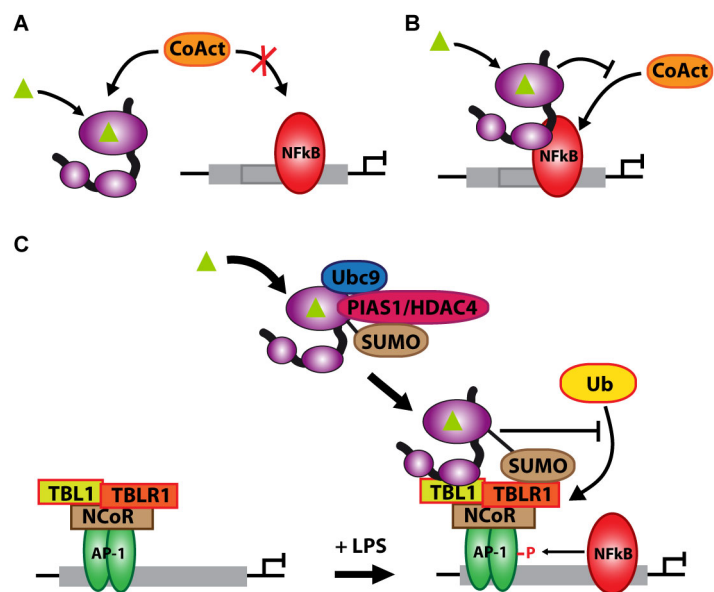


Fig I-5. Mecanismos de transrepresión de los RNs.

A. Secuestro de coactivadores. Los coactivadores son secuestrados por los RNs activados impidiendo su unión a NF κ B. **B.** Unión directa. La unión del RN a NF κ B impide la interacción con coactivadores. **C.** Transrepresión dependiente de sumoilación. La sumoilación del RN activado hace que se una al complejo represor e impide la ubiquitinación de este y su posterior degradación. CoAct, coactivador; Ub, maquinaria de ubiquitinación; \blacktriangle , ligando.

mecanismo de transrepresión de GR, y prototipo de mecanismo para otros RN, es la unión directa con los factores NF κ B o AP-1 (Figura I-5B). Esta unión altera la capacidad de NF κ B y AP-1 para unirse a sus coactivadores e iniciar la transcripción, favoreciendo la inhibición de los genes⁵². Otro mecanismo de transrepresión, en el que intervienen los complejos correpresores, fue el descrito para PPAR γ y LXR^{53,54}. Estos RN transreprimen la expresión de genes diana de NF κ B mediante el bloqueo de la liberación del complejo correpresor NCoR unido al promotor (Figura I-5C). La

degradación de NCoR es esencial para el inicio de la transcripción. En ella participan la proteína transducina β -like 1 (TBL1) y la proteína relacionada con TBL 1 (TBLR1), que forman parte de NCoR, la maquinaria de ubiquitinación y la subunidad del proteosoma 19S⁴⁹. En condiciones basales el complejo represor NCoR se encuentra unido a AP-1, el cual suele ubicarse cerca del sitio de unión de NF κ B en el promotor de sus genes diana⁵⁵. NF κ B se activa en respuesta a estímulos como el lipopolisacárido (LPS), que es un potente inmunógeno presente en la membrana de las bacterias gram negativas. Una vez activado, NF κ B media la fosforilación de AP-1 que, a través de TBL1 y TBLR1, promueve la ubiquitinación de NCoR y su posterior degradación⁵⁵ (Figura I-5C). La unión al ligando provoca la unión covalente de subunidades SUMO a PPAR γ o LXR. Esta modificación señala a estos receptores para su unión a NCoR. La unión de PPAR γ y LXR a NCoR previenen el reclutamiento de la maquinaria de ubiquitinación, lo que hace que NCoR permanezca unido al promotor. De este modo, se produce una menor tasa de expresión de los genes diana aunque se produzcan señales de activación de NF κ B⁴⁹.

1.2. El Receptor X de Retinoides (RXR)

RXR fue descubierto por Ron M. Evans y David J. Mangelsdorf como un nuevo RN, distinto de RAR, que respondía a ligandos de naturaleza retinoide procedentes del metabolismo de la vitamina A^{56,57}. Posteriormente, se identificó el ácido 9-cis retinoico (9cis-RA) como ligando natural de RXR. En mamíferos existen tres isotipos de RXR: RXR α (NR2B1), RXR β (NR2B2) y RXR γ (NR2B3). Cada isotipo se expresa en distintas isoformas, que se generan por *splicing* alternativo⁵⁸. RXR α se expresa de manera ubicua, especialmente en células mieloides, el hígado, los pulmones, el músculo, los riñones, la epidermis, el intestino y es el isotipo mayoritario en la piel; la expresión de RXR β es también ubicua; y la expresión de RXR γ se encuentra restringida al cerebro y a los músculos esquelético y cardíaco²³. Muchas de las funciones de estos isotipos de RXR son parcialmente redundantes⁵⁹.

RXR es un miembro destacado de la superfamilia de los RN, ya que es necesario para la función de muchos de ellos. RXR estabiliza la unión al ADN de la mayoría de receptores no esteroideos mediante la formación de heterodímeros^{19,60,61}. La heterodimerización con RXR también es necesaria para que estos receptores realicen el intercambio de sus correguladores en respuesta a ligando y así modulen la transcripción²⁵. La capacidad que tiene RXR para formar heterodímeros con otros RN implica que su activación tenga efectos pleiotrópicos, afectando a múltiples funciones fisiológicas. RXR también forma homodímeros capaces de regular la expresión

génica⁶²⁻⁶⁵, lo que plantea la existencia de una vía de señalización específica de RXR que no ha sido del todo explorada. Esta vía podría ser una diana terapéutica interesante para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, la dimerización promiscua con otros RN es un reto importante en el estudio de las funciones propias de RXR.

1.2.1. Ligandos de RXR

La búsqueda de un ligando natural para RXR concluyó con el descubrimiento del 9cis-RA, un derivado de la vitamina A^{66,67}. Este ligando tiene gran afinidad por todos los receptores RXR y es capaz de activar homodímeros de RXR⁶³. Aunque está presente durante el desarrollo en el embrión y se han identificado las enzimas dedicadas a su síntesis, la presencia de 9cis-RA en células de mamífero aún no está clara⁶⁸. Un estudio reciente describe la presencia de 9cis-RA en el páncreas, donde tiene efectos sobre la sensibilidad a la glucosa⁶⁹. 9cis-RA no es un ligando selectivo de RXR, porque también se une a RAR con alta afinidad⁷⁰. El análisis de los LBP de RXR y RAR demostró que la arquitectura de ambos dominios es muy diferente. La flexibilidad del compuesto 9cis-RA le permite introducirse en los LBP de ambos receptores⁷¹. Se han generado ligandos sintéticos específicos de RXR, como los agonistas LG100268 (LG268) y el LG100269 (bexaroteno o Targetin®), adaptados a las diferencias estructurales entre RXR y RAR. También se han descrito antagonistas de RXR de entre los que destaca LG100754 (LG754) que antagoniza a los homodímeros de RXR y activa los heterodímeros de RXR con PPAR γ , PPAR α y RAR³⁰. Estos agonistas y antagonistas que sólo son reconocidos por RXR se denominan rexinoides⁷², y controlan la actividad tanto de los homodímeros como de los heterodímeros formados por RXR con otros RN^{64,73}. Su síntesis es de gran importancia en el estudio de la actividad de RXR. Recientemente se ha descrito que RXR también se une a ácidos grasos, como el ácido docosahexaenoico o el ácido araquidónico, lo cual tiene posibles implicaciones en el control del metabolismo lipídico o la respuesta inmune⁷⁴.

1.2.2. Dimerización de RXR

RXR es el único RN que puede formar homodímeros y heterodímeros con otros RN. Esto se debe a su capacidad para formar dos tipos de uniones estables al dimerizar. La unión con otros RN se produce mediante una interacción asimétrica de las superficies de dimerización presentes en ambos receptores. Sin embargo, la interacción entre dos unidades RXR para formar homodímeros es simétrica, lo que produce un número menor de puntos de contacto entre ambas subunidades. Esto

hace que la homodimerización esté energéticamente desfavorecida frente a la heterodimerización aunque ambas estructuras existan de manera estable^{75,76}. RXR puede formar dímeros espontáneamente⁷⁷ o en respuesta a ligando⁷⁸. La unión de RXR con su ligando transmite un cambio conformacional a la superficie de dimerización, que a su vez puede transferirse a la estructura del compañero de heterodímero cambiando su conformación y su estado de activación⁷⁹. Según los efectos que provoque el ligando de RXR, los heterodímeros se pueden clasificar como permisivos o no permisivos (Figura I-6).

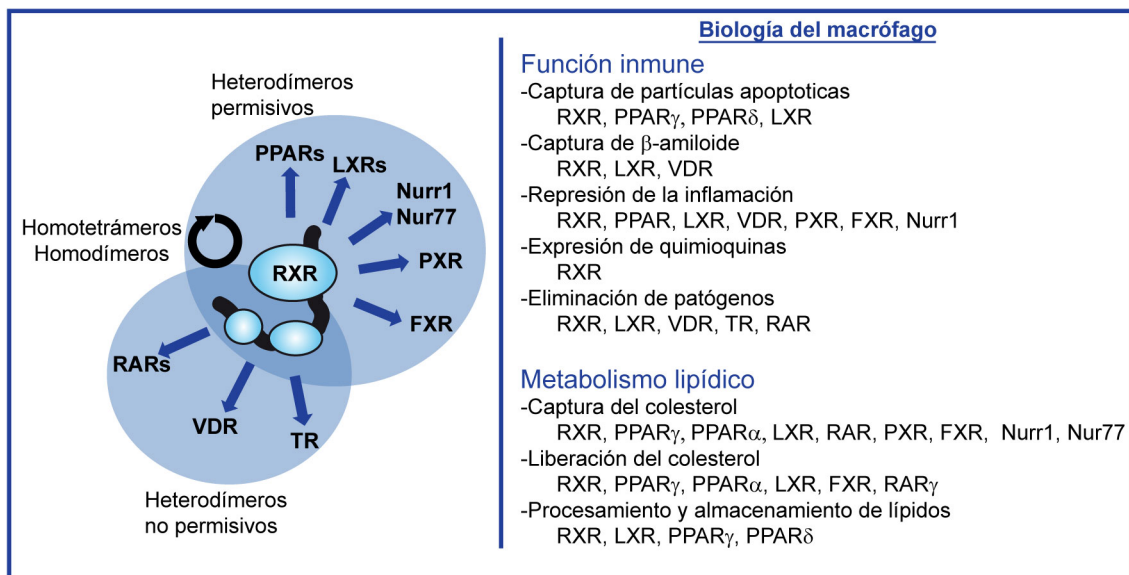


Fig I-6. Dimerización de RXR y funciones en el macrófago. RXR y los receptores con los que forma heterodímeros permisivos y no permisivos, y principales procesos biológicos que controlan en el macrófago. Adaptado de Roszer et al., Trends. Endocrinol. Metab., 2013.

Los receptores PPAR, LXR, FXR, Nurr1, Nur77 y PXR forman heterodímeros permisivos con RXR. Estos heterodímeros pueden activarse tanto por ligandos de RXR, como por los ligandos del otro receptor que forma el complejo. La unión del ligando a RXR hace que se establezca un acoplamiento alostérico entre ambos receptores, provocando un cambio conformacional en el LBD del receptor unido a RXR denominado efecto fantasma del ligando^{31,80}. Este efecto estabiliza el heterodímero y hace que la hélice 12 del dominio AF-2 del receptor unido a RXR se ubique en una conformación activa, la cual permite el reclutamiento de coactivadores, incrementando así su actividad transcripcional⁷⁵. Además, RXR también adquiere una configuración compatible con la unión a coactivadores. Cuando ambos receptores se encuentran unidos a ligando se produce un efecto sinérgico que incrementa la transcripción del gen diana. Puesto que el heterodímero se activa por cualquier ligando de los receptores que lo forman, se puede esperar que los patrones de expresión que regulan uno u otro ligando sean similares^{72,80,81}. Sin embargo, estudios recientes, en

los que se ha analizado la permisividad a escala genómica, sugieren que los rexinoides regulan sólo parcialmente los patrones de expresión controlados por los ligandos de los otros receptores que forman heterodímero permisivo con él⁸²⁻⁸⁵.

Los receptores que forman heterodímeros no permisivos son RAR, VDR y TR. A pesar de que RXR puede unirse a rexinoides cuando heterodimeriza con estos receptores, esta señal no es suficiente para activar al heterodímero. Estos RN poseen una hélice 12 más corta que les impide exponer la superficie de unión a coactivadores en respuesta al ligando de RXR⁷⁵. Estos heterodímeros no permisivos tienen actividad represora intrínseca porque, a diferencia de los heterodímeros permisivos, los RN que acompañan a RXR en estos heterodímeros se encuentran unidos a correpresores en ausencia de ligando. Esto hace que RXR no pueda unirse eficientemente a coactivadores, y por ello los genes controlados por heterodímeros no permisivos no se inducen por rexinoides. Cuando el compañero de RXR en estos heterodímeros se une a su ligando, se produce la liberación del correpresor y el reclutamiento de coactivadores permitiendo la transcripción^{86,87}. En el caso de RAR, la configuración que adquiere este receptor al unirse a su ligando permite que RXR unido a rexinoides se una al coactivador reclutado por RAR, estabilizando aún más su unión al heterodímero. Esto provoca un efecto sinérgico que incrementa la actividad transcripcional del heterodímero⁸⁸. En cambio, VDR y TR no responden a rexinoides, aunque se encuentren unidos a sus ligandos⁷⁹. Sin embargo, estudios recientes apuntan a que en ciertos casos los ligandos de RXR sí pueden potenciar la actividad transcripcional de VDR⁸⁹.

RXR también forma homodímeros cuando se une a sus ligandos, pero en estado basal se encuentra secuestrado en forma de tetrámero⁹⁰⁻⁹². Estas estructuras actúan como un mecanismo de autosilenciamiento, ya que aunque pueden unirse al ADN, son transcripcionalmente inactivos^{93,94}. Estos complejos se forman espontáneamente por interacciones intermoleculares que se establecen entre la hélice 12 de una subunidad de RXR y la siguiente. Cuando RXR se une a su ligando, estas interacciones intermoleculares desaparecen y RXR se disocia en forma de homodímeros o heterodímeros con otros receptores. La disociación del tetrámero supone un mecanismo de regulación de la transcripción, porque aumenta la disponibilidad de RXR accesible para otros receptores a los que RXR se une preferentemente⁹⁵⁻⁹⁷.

Aunque la formación de homodímeros de RXR está desfavorecida en presencia de otros receptores, existen evidencias de su actividad transcripcional^{63,64}. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que los homodímeros de RXR pueden activar la expresión de genes que poseen elementos DR-1 en sus promotores⁶³. De hecho,

los homodímeros de RXR pueden regular genes diana de PPAR (que también reconoce elementos DR-1) *in vitro*, aunque la existencia de esta señalización *in vivo* es controvertida⁶⁵. Un estudio reciente, en el que se analizó la regulación de la transcripción por rexinoides *in vitro* a escala genómica, sugiere la existencia de rutas de señalización controladas por RXR con independencia de otros receptores⁸². En nuestro laboratorio se han descrito evidencias de la existencia de una vía de señalización específica de RXR *in vivo* que controla la migración leucocitaria y la sepsis a través de homodímeros de RXR α ⁹⁸. Existen pocos estudios que demuestren la existencia de una vía de señalización específica de RXR *in vivo*, ya que es difícil descartar la implicación de otros receptores que medien la actividad de RXR como heterodímeros permisivos activados por rexinoides.

1.2.3. Localización genómica de RXR

RXR puede encontrarse unido al ADN en ausencia de ligando⁷⁷. Los estudios recientes, empleando la tecnología de secuenciación masiva, confirman la presencia de RXR en la mayoría de sitios de unión de heterodímeros en el genoma. El tratamiento con ligandos o la sobreexpresión de los compañeros de heterodímero dan lugar a la estabilización de estos complejos unidos al ADN y a la aparición de nuevos sitios de unión. Por ello, RXR parece funcionar como punto de anclaje en el genoma, dispuesto en sitios específicos donde se unen otros receptores de manera específica. Esta unión específica está determinada por la secuencia del HRE o por la presencia de ciertos cofactores o factores de transcripción específicos del tipo celular⁹⁹⁻¹⁰³.

1.2.4. RXR en el tratamiento de enfermedades

RXR tiene la capacidad de activar distintos programas de expresión génica actuando a través de sus homodímeros y de los heterodímeros que forma con otros RN. Esta característica especial ha hecho que RXR se haya estudiado como posible diana terapéutica para el tratamiento de múltiples enfermedades, como el cáncer o aquellas relacionadas con el metabolismo o la respuesta inmune¹⁰⁴.

Los ligandos derivados del ácido retinoico o retinoides han sido utilizados satisfactoriamente en clínica para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y algunos tipos de cáncer como la leucemia aguda promielocítica (APL)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Sin embargo, los retinoides, que actúan a través de RAR/RXR y RXR/RXR, tiene muchos efectos secundarios entre los que destaca la teratogénesis¹⁰⁵. En un intento por reducir estos efectos secundarios se ha probado el uso de ligandos específicos para activar selectivamente RAR y RXR. Así se desarrollaron los primeros rexinoides¹⁰⁸. Los rexinoides se consideraron en un principio agentes sinérgicos de los retinoides, ya

que sólo se observaba su efecto sobre RAR en presencia de ácidos retinoicos. Sin embargo, ahora se sabe que el uso de rexinoides puede producir efectos asociados a homodímeros de RXR o a otros heterodímeros. El único rexinoides aprobado para su uso terapéutico hasta el momento es el bexaroteno. Este ligando se utiliza para el tratamiento, por vía oral y tópica, del linfoma cutáneo de células T¹⁰⁹. Sin embargo, no ha demostrado ser eficiente en el tratamiento de tumores sólidos. El rexinoides LG268 obtuvo buenos resultados en el tratamiento de cáncer pancreático en un modelo murino¹¹⁰, pero no se observaron cambios significativos en los ensayos clínicos. Además de su aplicación en cáncer, los rexinoides también tienen un potencial efecto terapéutico en otras patologías como la diabetes, la obesidad, la aterosclerosis y en enfermedades inflamatorias mediante vías que dependen principalmente de los receptores PPAR^{72,105,111} y LXR¹¹². Se han realizado ensayos clínicos con rexinoides y se ha observado que éstos emulan el efecto anti-diabético de ligandos de PPAR, como la rosiglitazona¹¹³. Parte del efecto de los rexinoides en diabetes se debe a la activación de RXR/PPAR γ . Sin embargo, la activación de RXR también tiene efectos independientes de PPAR que favorecen la sensibilidad a la insulina¹⁰⁴. La activación promiscua de varios heterodímeros, en respuesta a rexinoides, hace que su efecto terapéutico en diabetes sea distinto del obtenido con el tratamiento con ligandos de PPAR. El tratamiento con rosiglitazona produce la sensibilización a la insulina, que va acompañada de una reducción en triglicéridos y un aumento de la masa corporal y el tejido graso. Por otro lado, los rexinoides también producen sensibilización a la insulina pero al contrario que los ligandos de PPAR, reducen la masa corporal y de tejido graso así como el apetito. Sin embargo, el uso de rexinoides tiene asociado efectos adversos como el aumento de triglicéridos, la falta de apetito o la inducción de hipotiroidismo^{72,114-117}. Por ello, su uso como fármaco ha tenido un desarrollo escaso. La combinación de rexinoides con rosiglitazona provoca un efecto sinérgico que favorece la sensibilidad a la insulina, y evita algunos efectos adversos asociados a los tratamientos individuales, como la hipertrigliceridemia^{72,118,119}. La posibilidad de activar vías de señalización dependientes de heterodímeros permisivos a través de RXR es interesante, porque las características cinéticas de la activación por rexinoides son distintas a las de los otros ligandos y esto puede que favorezca el efecto terapéutico¹²⁰. Por ello, una nueva vía de estudio en el campo de los RN consiste en el desarrollo de moduladores de RXR capaces de activar o inhibir dímeros específicos^{32,72,121}. La activación de heterodímeros u homodímeros de RXR con rexinoides puede ser una alternativa para el tratamiento de ciertas patologías para las que actualmente se utilizan ligandos de otros RN que causan efectos adversos¹¹⁸.

1.3. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato esta formado por un conjunto de mecanismos que generan una respuesta inespecífica pero rápida ante una amenaza para el organismo. Esta respuesta es importante para la activación del sistema inmune adaptativo que provoca una respuesta específica más lenta contra el patógeno. Estos sistemas de protección inmunológica han evolucionado para funcionar juntos en la eliminación de patógenos y en la restauración de la homeostasis del organismo.

El sistema inmune innato es la primera barrera de protección del organismo, y surge de manera temprana en la evolución con la aparición de receptores que permiten a la célula efectora, como el macrófago, el reconocimiento inespecífico de gran variedad de patógenos¹²². La respuesta inmune innata se compone de mecanismos celulares y humorales que participan en el reconocimiento de diversas señales de peligro, favorecen la eliminación de agentes infecciosos e intervienen en la restauración de la homeostasis¹²². Algunos de estos componentes son compartidos con el sistema inmune adaptativo.

1.3.1. Componente celular

El componente celular del sistema inmune está formado por un grupo heterogéneo de células que funcionan coordinadamente para detectar y corregir el desequilibrio homeostático causado por un daño tisular, un agente infeccioso o un proceso tumoral¹²². El grupo más importante lo forman los leucocitos, que son células sanguíneas nucleadas sin capacidad de división y proceden de células progenitoras presentes en la médula ósea. Los leucocitos se clasifican en células mieloides y células linfoides, según la célula hematopoyética de la que proceden. Las células mieloides incluyen los granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos) y los monocitos. Los macrófagos proceden de la diferenciación de monocitos en el tejido¹²². Las células linfoides son los linfocitos B y T y las células asesinas naturales (NK). Otros tipos celulares con funciones relevantes en el sistema inmune son las células dendríticas y los mastocitos, que son células residentes en los tejidos. En la respuesta inmune innata participan todas las células descritas excepto los linfocitos T y B¹²².

Los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos se denominan fagocitos, ya que reconocen la estructura del patógeno y lo aíslan envolviéndolo con su membrana en un proceso denominado fagocitosis. Los macrófagos y las células dendríticas son también células presentadoras de antígeno, que activan a los linfocitos B, por lo que hacen de puente entre la respuesta innata y la adaptativa. La correcta eliminación de restos celulares por fagocitosis es vital para el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica y para evitar la respuesta autoinmune. Los diferentes

tipos celulares del sistema inmune pueden detectarse mediante marcadores que suelen ser receptores característicos presentes en la superficie celular. Estos marcadores se utilizan para identificar y cuantificar poblaciones celulares presentes en muestras biológicas, generalmente en sangre, mediante citometría de flujo.

1.3.2. Componente humoral

Además de las células, el sistema inmune innato está compuesto por un grupo de proteínas presentes en el plasma sanguíneo, producidas por las células del sistema inmune o en el hígado y que se inducen en respuesta a estímulos¹²³.

- Sistema del complemento

El sistema del complemento lo forman un conjunto de proteínas solubles producidas principalmente en el hígado y algunas proteínas de membrana que reaccionan frente a estructuras ajenas al organismo. Se encuentran en forma inactiva en el plasma sanguíneo o en la membrana celular. Estas proteínas se activan por una reacción en cadena de proteólisis inducida por antígenos ajenos al organismo, dando lugar a un complejo de ataque que desestabiliza al patógeno¹²³. Ciertas proteínas del complemento cubren la superficie del patógeno y facilitan su reconocimiento por células como el macrófago, que lo fagocitan para destruirlo. El complemento consta de dos vías de activación. La vía clásica incluye las proteínas del complemento: C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9 y algunos derivados proteolíticos. Los componentes de la vía alternativa incluyen componentes de la vía clásica, así como la properdina y los factores H, B y D.

- Opsoninas

Las opsoninas son proteínas solubles coadyuvantes de la fagocitosis. Estas proteínas se unen a los antígenos para facilitar su reconocimiento y posterior eliminación. Los macrófagos y los neutrófilos poseen receptores que reconocen con alta afinidad las estructuras cubiertas por opsoninas y las fagocitan. Los derivados proteolíticos de miembros del sistema del complemento C3b, C4b o iC3b y la lectina fijadora de manosa son opsoninas, que se unen al patógeno de manera inespecífica¹²³.

- Citoquinas

Son proteínas solubles de bajo peso molecular que actúan como mediadores en la comunicación intercelular. Estas moléculas se producen prácticamente en todas las células y tienen especial importancia en las funciones de los leucocitos¹²³. Las

citoquinas actúan sobre las células mediante la unión a receptores de membrana, transmitiendo una señal intracelular, que provoca un cambio en sus funciones biológicas¹²³. Estas moléculas son fundamentales en la iniciación y la resolución de la respuesta inflamatoria. Las citoquinas se pueden clasificar en dos grandes familias: las interleuquinas, que intervienen sobretudo en la comunicación entre leucocitos; y las quimioquinas, encargadas de la quimiotaxis celular. Otras familias importantes de citoquinas son los interferones ($\text{IFN}\alpha$, β y γ) y los factores de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$ y β).

Las quimioquinas son citoquinas con propiedades quimioatrayentes que coordinan la migración leucocitaria hacia las zonas donde se produce el daño tisular o infección. Son péptidos de pequeño tamaño, entre 70 y 125 aminoácidos, secretados por leucocitos y otras células del sistema inmune. Se han descubierto por el momento 60 quimioquinas en mamíferos¹²⁴. Estas moléculas se unen a receptores de membrana específicos, acoplados a proteínas G. Cada tipo celular es sensible a un grupo concreto de quimioquinas para las que tiene receptores de membrana específicos^{124,125}. Las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9* se expresan a partir de genes parálogos separados sólo por 9,4kb en el cromosoma 11 y muestran un alto grado de homología¹²⁶. Las proteínas CCL6 y CCL9 se unen débilmente al receptor CCR1, aunque su afinidad se incrementa tras su procesamiento proteolítico en el exterior celular por el que pierden su extremo N-terminal, adquiriendo incluso mayor afinidad que los agonistas clásicos de este receptor (CCL3 y CCL5). La pérdida del extremo N-terminal puede producirse en el inicio de la respuesta inflamatoria, cuando diversas proteasas se liberan al medio¹²⁷. De este modo, la disponibilidad de CCL6 y CCL9 en el inicio de la inflamación es muy alta, ya que se expresan constitutivamente para luego ser activadas inmediatamente ante la presencia de la amenaza^{128,129}. Aunque se conoce su implicación en diversas patologías inflamatorias su regulación transcripcional no ha sido caracterizada¹²⁹⁻¹³¹.

1.4. Inflamación

La inflamación es la primera fase de la repuesta inmune innata que se activa frente a infecciones o daño tisular^{132,133}. Es una adaptación del organismo a la pérdida de homeostasis celular y tisular. La inflamación se ha estudiado con especial interés en el contexto de los procesos infecciosos, aunque también se activa cuando se produce daño tisular por trauma. Los mecanismos inflamatorios que se activan en ambos casos son muy similares e incluyen agentes celulares y humorales. En el inicio de la inflamación los macrófagos residentes en el tejido reconocen a los patógenos a través de diversos receptores de membrana, y los eliminan por fagocitosis. Los

receptores de membrana transmiten una señal al núcleo por diversas vías de señalización, que finalmente activan la transcripción de cientos de genes dirigidos a neutralizar la amenaza¹³⁴⁻¹³⁷. Los productos de estos genes son mediadores inflamatorios entre los que se incluyen citoquinas, quimioquinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y factores del sistema del complemento. El efecto inmediato de estos mediadores es la activación del endotelio, el cual responde aumentando su permeabilidad y permitiendo el paso de proteínas del plasma sanguíneo y leucocitos (principalmente neutrófilos) al foco de inflamación. Las quimioquinas liberadas promueven la migración leucocitaria y se produce la extravasación de neutrófilos, que se activan por el contacto directo con el patógeno o por citoquinas secretadas por los macrófagos. Los neutrófilos tratan de destruir el agente invasor mediante la liberación del contenido de sus gránulos, que incluye especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS), proteinasa 3, catepsina G y elastasa¹³⁸. Estos efectores tan potentes no discriminan entre el tejido propio y el patógeno por lo que también producen daños en los tejidos del organismo¹³². Los neutrófilos reclutan a su vez a los linfocitos, los cuales re-estimulan a los macrófagos al interactuar con ellos.

Durante la respuesta inflamatoria muchas células son destruidas o quedan dañadas. La liberación de proteínas intracelulares durante la necrosis celular al medio intercelular puede causar la sobreestimulación de los macrófagos y la presentación de estas proteínas como antígenos a las células B, causando la pérdida de auto-tolerancia inmunológica. Para evitar estos efectos adversos, los neutrófilos inviables y células somáticas dañadas durante la inflamación entran en un proceso de muerte programada denominado apoptosis. Las partículas apoptóticas resultantes contienen las proteínas inmunogénicas, que son retiradas de manera segura por los macrófagos evitando así la liberación de su contenido. La acumulación de células apoptóticas en el organismo también es perjudicial, porque fuerza la estimulación de las células del sistema inmune adaptativo, provocando el reconocimiento de los antígenos propios como amenazas, perdiéndose así la auto-tolerancia inmunológica. Por ello, es muy importante la función de los macrófagos y otros fagocitos que capturan y digieren estas partículas. Los macrófagos que fagocitan las células apoptóticas adquieren un fenotipo anti-inflamatorio que favorece la resolución de la inflamación. Es muy importante que esta resolución se produzca en el momento adecuado, ya que la activación celular prolongada puede dar lugar a daños en los tejidos, un shock endotóxico u otras patologías.

1.4.1. Sepsis

La inflamación es un mecanismo de protección del organismo, sin embargo, cuando se produce una activación descontrolada del sistema inmune, el resultado puede ser perjudicial. Cuando esto ocurre se produce una patología muy compleja denominada sepsis. La sepsis se caracteriza por la activación del sistema del complemento y la activación exagerada de la respuesta celular. Como consecuencia de esta respuesta se produce la coagulación intravascular diseminada y posteriormente el fallo multiorgánico¹³⁹. La principal razón del establecimiento de la sepsis es una respuesta exagerada de los neutrófilos y los macrófagos a citoquinas, quimioquinas, proteínas del complemento y otros mediadores liberados en la respuesta inicial frente a una infección. La correspondiente inducción de ciertos lípidos, así como ROS y NOS dan lugar a daños en los tejidos que pueden provocar la muerte del organismo.

1.4.2. Receptores *Toll-like* y la regulación del factor de transcripción NFκB

Los receptores *Toll-like* (TLR) son una familia de receptores de membrana presentes en la mayoría de células del sistema inmune. Estos receptores reconocen patrones moleculares en las estructuras de componentes de distintos patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Este grupo de receptores lo forman los TLR1-TLR11, cada uno con una especificidad hacia un tipo de estructura concreta. Por ejemplo, el TLR4 reconoce el LPS presente en la membrana de las bacterias Gram negativas, el TLR5 se une a la flagelina de las bacterias flageladas y el TLR3 reconoce el ARN de doble cadena de los virus¹⁴⁰. La función principal de los TLR es el reconocimiento del patógeno para su posterior eliminación. Sin embargo, estos receptores también contribuyen al desarrollo de ciertas enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis, la artritis, la diabetes, el Alzheimer, la sepsis o el cáncer¹⁴¹⁻¹⁴³.

La función de TLR4 se ha estudiado en multitud de modelos de enfermedades inflamatorias y se conoce muy bien su mecanismo molecular^{122,135}. El LPS es el ligando más conocido de TLR4 y es un potente inmunógeno que activa a muchas de las células del sistema inmune, especialmente a los macrófagos. La unión del LPS a TLR4 inicia una cascada de señalización intracelular que termina con la activación de vías de señalización pro-inflamatorias, como la de NFκB, AP-1 o IRF. La activación de NFκB provoca la inducción de cientos de genes entre los que se incluyen citoquinas pro-inflamatorias y enzimas que catalizan la producción de ROS, óxido nítrico (NO) y lípidos pro-inflamatorios como las prostaglandinas. Todos estos genes están dirigidos a la eliminación del patógeno. Basalmente, los promotores de muchos de los genes regulados por TLR están ocupados por complejos represores como NCoR o SMRT,

que inhiben su expresión¹⁴⁴. Estos complejos se degradan mediante distintos mecanismos cuando se activa el TLR⁵⁵, permitiendo la unión de coactivadores y el inicio de la transcripción.

1.5. Macrófagos

Los macrófagos son células especializadas del sistema inmune dedicadas al mantenimiento de la homeostasis del organismo. Sus funciones principales son la detección y eliminación de cuerpos extraños y patógenos en el organismo¹⁴⁵. Existen macrófagos residentes en la mayoría de tejidos, y en algunos de ellos existen macrófagos muy especializados, como las células Kupffer en el hígado, las células dendríticas en la piel, los osteoclastos en los huesos, la microglía en el cerebro, etc. Recientemente se ha descrito que estas células denominadas colectivamente macrófagos residentes tienen en realidad distintos orígenes embrionarios¹⁴⁶. En un proceso inflamatorio, se produce un reclutamiento de macrófagos hacia el tejido dañado. Estos macrófagos proceden de la diferenciación de monocitos que extravasan desde la sangre¹⁴⁵. Estos monocitos circulantes reciben estímulos del endotelio cercano a la zona de inflamación (NO, TNF α ...) que provocan su adhesión. Entonces comienzan a rodar por la superficie del endotelio hasta detenerse y entrar al tejido por diapedesis a través del endotelio. El contacto con el tejido estimula la diferenciación del monocito en macrófago.

1.5.1. Activación clásica y alternativa del macrófago

Los macrófagos pueden existir en un amplio espectro de fenotipos diferentes dependiendo del programa transcripcional que tengan activo. Se han descrito diferentes estímulos que permiten al macrófago la polarización hacia cada fenotipo¹⁴⁷. Los fenotipos más estudiados son el pro-inflamatorio o activación clásica del macrófago (M1) y el anti-inflamatorio o activación alternativa (M2). Aunque en realidad existe todo un espectro de fenotipos intermedios, con características y funciones propias, entre los M1 y los M2 que han sido descrito *in vito*¹⁴⁷ e *in vivo*¹⁴⁶. Los macrófagos expuestos a ligandos de los TLR o al IFN γ adquieren el fenotipo M1, caracterizado por la secreción de citoquinas, la liberación de ROS y NO, para la eliminación de patógenos. Algunos componentes humorales de la respuesta inmune, como las opsoninas o algunas subunidades del sistema del complemento, también pueden activar el programa pro-inflamatorio a través de receptores presentes en la membrana del macrófago¹⁴⁸. Los macrófagos M2 pueden generarse por estimulación con las interleuquinas IL4 e IL13 y se caracterizan por la expresión del receptor de manosa¹⁴⁹, un aumento de la actividad arginasa, y la producción de componentes de la

matriz extracelular¹⁵⁰. La función principal del macrófago M2 es la fagocitosis de restos celulares y de patógenos, la recuperación del tejido dañado y la modulación de la respuesta inmune. Los macrófagos tienen una gran capacidad de adaptación a las condiciones del microambiente que les rodea. Esto les permite que durante el desarrollo de la respuesta inmune puedan cambiar de un fenotipo pro-inflamatorio a un fenotipo anti-inflamatorio para facilitar la recuperación de la homeostasis tisular¹⁵¹.

La fagocitosis de partículas apoptóticas puede inducir el fenotipo M2 en el macrófago mediante mecanismos que aún están poco descritos¹⁵². Las células apoptóticas presentan una serie de marcadores en la membrana que son reconocidos por receptores específicos en la membrana del macrófago. El marcador más característico de apoptosis es la exposición de fosfatidilserina (PtdSer) en la membrana celular. También se producen cambios en las glicoproteínas y lípidos de la superficie celular. Otros marcadores incluyen la trombospondina o el componente del complemento C1q, los cuales se unen a la superficie de las células apoptóticas; la molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM3); o la lipoproteína de baja densidad oxidada (OxLDL)¹⁵³⁻¹⁵⁵. Los receptores que reconocen estas señales en el macrófago incluyen: las lectinas que unen azúcares alterados¹⁵⁶; el receptor vitronectina, que se une a la trombospondina¹⁵⁷; receptores *scavenger* que se unen a OxLDL¹⁵⁸; CD14, que se une a ICAM3¹⁵⁴; la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja afinidad (LRP1) que se une a C1q^{159,160}; y el receptor tirosina quinasa MER, que se une a la proteína GAS6¹⁶¹. La degradación de partículas apoptóticas en el macrófago induce la liberación de la interleuquina 10 (IL10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β). Estos agentes tienen un potente efecto anti-inflamatorio en este contexto. La IL10 induce la expresión de diversos reguladores negativos de la respuesta inflamatoria¹⁶² y TGF β estimula la reparación tisular¹⁶³.

1.5.2. Los macrófagos en patologías metabólicas e inflamatorias

Existen múltiples puntos de unión entre la regulación de la respuesta inflamatoria y el metabolismo lipídico. El estado inflamatorio cambia el metabolismo celular y a su vez las enfermedades metabólicas crónicas pueden provocar reacciones inmunológicas anormales. Los macrófagos son clave en el desarrollo de diversas patologías caracterizadas por una respuesta inmune frente a un desequilibrio metabólico. Los macrófagos presentes en las lesiones ateroscleróticas acumulan colesterol y se convierten en células espumosas. Estas células adquieren un fenotipo pro-inflamatorio que promueve la degeneración del vaso sanguíneo en la aterosclerosis^{164,165}. Los macrófagos asociados a tumores sólidos suelen tener un fenotipo parecido a M2. Estos segregan factores de crecimiento y promueven la

angiogénesis facilitando la progresión del tumor¹⁶⁶. En la diabetes mellitus tipo 2, los lípidos acumulados en el tejido adiposo son reconocidos por los receptores TLR de los macrófagos residentes en ese tejido y provocan su polarización hacia un fenotipo M1. Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por estos macrófagos, como TNF α o la interleuquina 6 (IL6), interfieren en la señalización de la insulina, promoviendo así la resistencia a dicha hormona por parte de los adipocitos y otras células diana, como los miocitos o los hepatocitos^{167,168}. Los adipocitos responden aumentando la lipólisis y activando la vía de NF κ B. Esto promueve la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que activan a su vez a los macrófagos y atraen a más leucocitos, contribuyendo así al desarrollo de la diabetes.

1.5.3. Los receptores nucleares en las funciones de los macrófago

Los RN tienen un papel clave en la comunicación entre metabolismo y respuesta inmune ya que son sensores de diversos lípidos y controlan la transcripción a diferentes niveles. Por ello se ha estudiado con interés su papel en la biología del macrófago en procesos patológicos. Los macrófagos expresan 29 RN de los que 15 heterodimerizan con RXR¹⁶⁹. Entre ellos, solo PPAR, LXR y Nurr1/Nur77 forman heterodímeros permisivos con RXR. Los RN realizan tres actividades principales en el macrófago: GR, VDR, ER, PPAR γ y LXR regulan negativamente la expresión de genes controlados por los factores de transcripción NF κ B o AP-1; PPAR y LXR controlan el metabolismo lipídico; y unos pocos RN modulan ciertos programas especializados de diferenciación¹⁷⁰. RXR se expresa en macrófagos, siendo el isotipo mayoritario RXR α . RXR β también se expresa pero en menor medida y RXR γ no es detectable. RXR es esencial para las funciones de PPAR y LXR en el metabolismo lipídico del macrófago^{171,172}. PPAR y LXR también regulan la actividad inmunológica del macrófago, pero el papel de RXR en estas funciones aún no ha sido explorado. Sin embargo, nuestros resultados indican que RXR tiene un papel importante en migración leucocitaria durante procesos inflamatorios⁹⁸. PPAR y LXR destacan sobre otros RN en la biología de los macrófagos porque permiten la comunicación entre el metabolismo y la respuesta inmune de este tipo celular. PPAR y LXR controlan el transporte y metabolismo del colesterol en el macrófago. PPAR γ induce la expresión de LXR y otros genes como *Abcg1*, a su vez LXR induce otros genes como *Abca1*, que facilitan la liberación de colesterol hacia el exterior celular y apolipoproteínas que favorecen el correcto transporte y eliminación de este¹⁷³. Por ello, los ligandos de estos RN han demostrado tener efecto protector en la aterosclerosis, mediante la liberación del colesterol acumulado en los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas^{174,175}. La

activación de PPAR γ y LXR también inhibe el programa pro-inflamatorio de los macrófagos mediante el mecanismo de transrepresión, favoreciendo también la recuperación de la homeostasis en enfermedades de origen inflamatorio. Recientemente, se ha demostrado que el ligando de LXR demosterol se acumula en las células espumosas de las lesiones ateroscleróticas y favorece un fenotipo M2 en dichas células obtenidas *in vitro*, como resultado de la transrepresión de genes pro-inflamatorios a través de LXR¹⁷⁶. La transrepresión de genes pro-inflamatorios en macrófagos también se ha sugerido como uno de los mecanismos por lo que los ligandos de PPAR γ favorecen la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos¹⁷⁷. Además, recientemente se ha demostrado que LXR y PPAR δ tienen un papel importante en el control de la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos^{178,179}. Nuestros resultados también sugieren que PPAR γ y RXR α participan en la fagocitosis de partículas apoptóticas, favoreciendo el fenotipo M2 en el macrófago y protegiendo frente a la pérdida de auto-tolerancia inmunológica¹⁸⁰.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es explorar las funciones de RXR en el control de la transcripción, tomando como modelo la respuesta inflamatoria en el macrófago. Para ello, se analizan los efectos de los ligandos de RXR en la biología del macrófago, así como la contribución específica de RXR a las funciones de otros receptores nucleares, que heterodimerizan con RXR, en procesos de la respuesta inmune. Los objetivos concretos son:

1. El análisis del papel de RXR en el control del inicio de la respuesta inflamatoria en los macrófagos.
2. La caracterización de las funciones de RXR en la adquisición del fenotipo anti-inflamatorio en el macrófago tras la fagocitosis de partículas apoptóticas.
3. El estudio del efecto de los ligandos de RXR sobre la transcripción de genes pro-inflamatorios en macrófagos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

GW327647 (GW647) y GW610742X (GW742) fueron un obsequio de Tim Willson (*GlaxoSmithKline*). LG100268 (LG268) y LG100754 (LG754) fueron un regalo de Reid Bissonette (*Ligand Pharmaceutical*), Rosiglitazona (Rosi) fue adquirida de *Cayman*, el ligando GW3965 de Tocris; T1317 y el ácido 9-cis retinoico (9cis-RA) de *Sigma*. Para experimentos *in vitro* se utilizó el LPS de *Escherichia coli* O26:B6 y para tratamientos *in vivo* el LPS de *Escherichia coli* O111:B4 ambos adquiridos de *Sigma*. Las proteínas MCP1, CCL6 y CCL9 recombinantes de ratón fueron adquiridos de *PreproTech*.

3.2. Plásmidos

El vector de expresión de pCMX-hRXR α , su mutante pCMX-hRXR Δ AF-2, así como el de pCMX-mPPAR γ y pCMX-hLXR α han sido ya descritos previamente. Los vectores de RXR mutantes pSG5-hRXR α E453K y pSG5-hRXR α E456K fueron un regalo de Ana Aranda¹⁸¹. Las construcciones Ccl6-luc y Ccl9-luc con fragmentos de los promotores de *Ccl6* y *Ccl9* (1kb y 200pb) y sus versiones mutadas se clonaron en el vector pGL3-luc (*Promega*)⁹⁸. Los mutantes pCMX-hRXR α -AEE, pCMX-hRXR α Y402A, pCMX-hRXR α -DBDmut, pSG5-hPPAR γ -AFE y pSG5-hPPAR γ -R397C, así como las versiones mutadas de los promotores de *Ccl6* y *Ccl9*, se generaron por mutagénesis dirigida empleando el kit *QuikChange site-directed mutagenesis* (*Stratagene*), los cebadores empleados se muestran en la Tabla M1 (Anexo I). Los plásmidos AOX-3-luc, LXRE3x-luc, Nos2-luc, Cox2-luc y NF κ B3x-luc han sido descritos previamente¹⁸²⁻¹⁸⁴. Los plásmidos de expresión pCMV-CBP¹⁸⁵ y pcDNA3-SRC-1¹⁸⁶ han sido descritos.

3.3. Animales

Los ratones transgénicos *knock-in* LysMCre fueron cedidos por I. Förster (*University of Düsseldorf*, Alemania). La enzima Cre-recombinasa (Cre) expresada en estos ratones reconoce los sitios *lox* en el ADN y escinde la región comprendida entre estos sitios (región *flanked by lox* o *floxed*) en el genoma.

Para el estudio de las funciones de RXR se emplearon los ratones modificados genéticamente: RXR $\alpha^{fl/fl}$, LysCre-RXR α y LysCre-RXR $\alpha\beta$. Los ratones RXR $\alpha^{fl/fl}$ se obtuvieron de Ken Chien (*Harvard Stem Cell Institute and Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital*, Boston). Estos ratones tienen el exón 4 del gen de RXR α (donde se encuentra el sitio de unión al ADN) flanqueado por secuencias *lox* (*floxed*). Los ratones RXR $\beta^{fl/fl}$ fueron cedidos por Pierre Chambon

(*Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire*, Francia). Estos ratones poseen el gen RXR β flanqueado por secuencias *lox* en los exones 3 y 4¹⁸⁷.

Los ratones LysMCre-RXR α se generaron según el protocolo descrito previamente⁹⁸. Los ratones LysMCre tienen el gen Cre regulado por el promotor de la lisozima M, que se expresa constitutivamente en la línea mieloide (granulocitos y macrófagos). Los ratones LysMCre se cruzaron con los ratones RXR $\alpha^{fl/fl}$ hasta obtener crías RXR $\alpha^{fl/fl}$ Cre^{-/+}. Estos ratones se cruzaron a su vez con los ratones RXR $\alpha^{fl/fl}$. De estos cruces surgen los ratones con RXR *floxed* que expresan Cre, lo que hace que el gen RXR α sea deletado (RXR α KO). Los ratones que no expresan Cre se utilizaron como controles en los experimentos (RXR α WT). Los ratones LysMCre-RXR $\alpha^{fl/fl}$ Cre^{-/+} se cruzaron con ratones RXR $\beta^{fl/fl}$ para obtener la línea de ratón LysMCre-RXR $\alpha\beta$. Todas las líneas son consanguíneas y tienen un fondo genético C57BL/6. Los animales empleados proceden de la misma camada en cada experimento.

Los ratones deficientes en LXR $\alpha\beta$ ⁸¹; y aquellos deficientes en PPAR γ específicamente en la línea mieloide¹⁸⁸ han sido descritos previamente. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (*Jackson*) procedentes de una colonia de la Unidad de Animalario (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC).

Se emplearon ratones de entre 8 y 10 semanas. Todos los animales se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controladas. La comida y bebida se dejaron *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité ético del CNIC.

3.4. Cultivo celular

Los macrófagos peritoneales se aislaron y trataron según se ha descrito con anterioridad^{188,189}. Se inyectaron 2,5 mL de solución de tioglicolato 3% en el peritoneo para estimular la migración leucocitaria. Tres días después, los animales se sacrificaron por asfixia con CO₂ y se practicó un lavado peritoneal con 10mL de PBS estéril frío para recoger las células presentes en la cavidad peritoneal. Las células se resuspendieron en RPMI 10% FBS 1 % de penicilina/estreptomicina y se plaquearon durante 4 h, tras lo cual se lavaron con PBS. Las células adheridas son macrófagos (TG-MO), se mantuvieron en medio RPMI 0,5% FBS 1 % de penicilina/estreptomicina complementados con los ligandos a una concentración de 1 μ M durante 18 h. A continuación las células se estimularon con LPS (100ng/mL) durante 6 h. Para el estudio de transactivación las células se trataron durante 24 h con ligandos. Para ciertos experimentos los sobrenadantes se recogieron para usarlos como medios

condicionados. En los ensayos con células apoptóticas, las ATs se añadieron al cultivo de macrófagos en un ratio 5:1 (ATs:macrófagos) durante 30 min o 24 h. En determinados experimentos las ATs se retiraron mediante un lavado suave con PBS y los macrófagos se incubaron con LPS (100 ng/mL) durante 5 h para analizar la expresión génica, o durante 18 h para el estudio de la secreción de citoquinas. La línea celular murina de macrófagos *Raw 264.7* se mantuvo en cultivo con DMEM al 10% de suero fetal bovino (FBS).

3.5. Análisis de ARN

Se purificó ARN total de TG-MO usando TRIzol (*Invitrogen*) o *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*). El ARN se retrotranscribió con el kit *High capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*). Se realizaron PCRs cuantitativas en tiempo real (qPCR) en un termociclador *ABI 7900 Fast* (*Applied Biosystems*), preparando mezclas de volumen final 10 µL con *SYBR Green* (*Applied Biosystems*) según indicaciones del fabricante. Las mezclas se incubaron 15 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 10 seg a 95 °C, 20 seg a 60 °C, y 30 seg a 72 °C. Los cebadores utilizados para cada gen se diseñaron cada uno en un exón diferente para evitar la detección de ADN genómico. La cuantificación se calculó normalizando frente al gen endógeno 36b4. La lista de cebadores empleados se encuentra en la Tabla M2 (Anexo I).

3.6. Southern blot y análisis de ADN por PCR

Se obtuvo ADN de distintos tejidos empleando el kit *Wizard Genomic ADN* (*Promega*). El realizó un protocolo estándar de *Southern blot* utilizando las enzimas de restricción BamHI y BglII para digestión¹⁹⁰. Las sondas utilizadas para la detección del ADN específico y las condiciones de PCR para el genotipado de los tejidos han sido descritas anteriormente¹⁹¹. Las bandas de ADN amplificado fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa del 2% y visualizadas añadiendo bromuro de etidio en cámara de luz ultra violeta.

3.7. Tarjetas microfluídicas

Se utilizaron muestras de cADN preparadas como se ha indicado en tarjetas microfluídicas *TaqMan Mouse Immune Panel (Applied Biosystems)*. Los datos se analizaron con el programa SDS 2.1 y *RQ Manager (Applied Biosystems)*.

3.8. Estudio de expresión génica por microarray

Los TG-MO se incubaron con los diferentes ligandos (1 μ M) durante 18 h y posteriormente se estimularon con LPS (100ng/mL) durante otras 6 h. El ARN total se aisló utilizando TRIzol (*Invitrogen*), digerido con DNAsa I y después purificado por columna (*RNeasy Minelute Cleanup, Qiagen*). El cARN se generó a partir de 10 μ g de ARN total usando el *SuperScript kit (Invitrogen)*. Los fragmentos de cARN se hibridaron en un *Agilent 4x44 Mouse Chip (Agilent)* según instrucciones del fabricante. Los chips se escanearon en un *Agilent DNA Microarray Scanner (G2565BA, Agilent)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron datos del análisis de las imágenes utilizando el programa de análisis de imagen *Agilent Feature Extraction (AFE)*. Los datos se editaron y analizaron en R (*R Development Core Team*) usando el paquete *Agi4x44PreProcess* que forma parte del proyecto *Bioconductor*. Posteriormente, los datos de los genes diferencialmente expresados se analizaron con DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov/) y HOMER (biowhat.ucsd.edu/homer/). Cada condición se hizo por triplicado. El agrupamiento de genes por similitud de patrón de expresión se realizó con la herramienta Genesis (genome.tugraz.at) y *Cluster 3.0 (Eisen Lab)*. Los datos de expresión se visualizaron con la herramienta *Treeview (Taxonomy and Systematics)*.

3.9. Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

Las transfecciones transitorias se realizaron en la línea celular de macrófago murino *Raw 264.7*. Se plaquearon 100.000 células por pocillos en placas de 24 pocillos en medio DMEM al 10% de FBS. Se dejaron en cultivo durante una noche, tras lo cual, se cambió el medio por Optimen (*Gibco*). Se preparó una mezcla de distintos plásmidos con Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) según indicaciones del fabricante. En cada reacción se añadieron 0,4 μ g de plásmido de expresión y 0,4 μ g de plásmido reportero de luciferasa. Cuando fue necesario se corrigió la cantidad de plásmido de expresión con el vector vacío para mantener la proporción de ADN frente a lipofectamina. En los ensayos en los que se sobreexpresó CBP o SRC-1 se utilizaron 500 ng de los plásmidos de expresión del coactivador, 200 ng del plásmido reportero y 100ng de pCMX-hRXR α . Se incubaron las células durante 5-6 h con dicha mezcla. Tras la transfección, las células se incubaron con medio DMEM al 0,5% de

FBS junto con los ligandos correspondientes (100 nM o 1 μ M) y LPS (100 ng/mL o 1 μ g/mL) según se indica. La actividad luciferasa se midió en un luminómetro *Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems)* tras la lisis con el *Reporter Lysis Buffer* utilizando el *Luciferase Assay System (Promega)*. Cada experimento se realizó por triplicado.

3.10. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Se emplearon oligonucleótidos complementarios que se hibridaron entre sí y marcados con P^{32} utilizando la enzima *Klenow (Roche)*. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en la Tabla M3 (Anexo I). Se aislaron proteínas de fusión de GST con RXR α a partir de lisados obtenidos de bacterias transformadas con el plásmido correspondiente. La proteína purificada de RXR α se incubó con el ADN marcado. Los complejos proteína-ADN se sometieron a electroforesis en un gel no desnaturalizante y se visualizaron mediante autorradiografía. Para los estudios de competición se añadió un exceso molar de 5-100 veces de ADN sin marcar.

3.11. Western blot

Se transfectaron células Hek 293 con los plásmidos de expresión de hRXR α , hRXR α -AEE, hRXR α Y402A, hPPAR γ ; hPPAR γ -AFE y hPPAR γ -R397C y se lisaron con buffer RIPA. Las proteínas del lisado se separaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10% y posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon hasta el día siguiente con TBS-Tween al 5% de leche a 4 °C y posteriormente se incubaron durante 1 h con el mismo buffer con los anticuerpos primarios anti-RXR α (sc-553), anti-PPAR γ (sc-7273) o β -actina (A 2066, Sigma). La detección se realizó empleando anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidada y *ECL Western Blotting Detection kit (GE Healthcare)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.12. Inmunoprecipitación de cromatina y análisis de ChIP-Seq

Se realizó inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de RXR, PPAR, LXR y p65. Para ello se emplearon 20-40 millones de macrófagos peritoneales por inmunoprecipitación. Las células se fijaron con disuccinimidil glutamato (DSG) (*Pierce*) 2 mM disuelto en PBS durante 30 min seguido de 0,75% formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. Las reacciones de fijación se neutralizaron con glicina a una concentración final de 125 mM durante 5 min. Las células se lavaron con PBS frío y se recuperaron separándolas de la placa con un rascador (Sarstedt, ref. 83.1830). Se

recuperaron los núcleos celulares lisando con los buffers L1A y L1B (Anexo II). Los núcleos se resuspendieron en el buffer RIPA (Anexo II). La cromatina se sonicó hasta obtener fragmentos de ADN de 100-500pb administrando pulsos de 30 seg a 12 W de potencia con descansos de 1 min entre pulso y pulso. Los extractos se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C para eliminar restos celulares. El lisado resultante se bloqueó con partículas de sefarosa CL4B durante 2 h a 4 °C. El sobrenadante se incubó 18 h a 4 °C en rotación con el anticuerpo correspondiente (RXR ChIP: 3µg de sc-553, 3µg de sc-774; PPAR γ ChIP: 1,5µg de sc-7196, 1,5µg de sc-1984). Los complejos unidos a anticuerpo se recuperaron con 40 µL de partículas de sefarosa con proteína A (*GE Healthcare*) durante 2 h a 4 °C. Las partículas se lavaron en columnas *Ultrafree MC Spin* (*Millipore*) siguiendo el orden: 3x Buffer RIPA, 6x Buffer de lavado LiCl y 2x TE, y se eluyó con 200 µL de buffer de elución (Anexo II). El eluido de la columna se incubó con NaCl hasta el día siguiente a 65 °C para revertir la fijación del ADN con las proteínas. Las muestras se trataron con RNasa A durante 1 h a 37 °C y posteriormente con proteinasa K 1 h a 55 °C. El ADN se purificó utilizando el kit *ChIP DNA Clean & Concentrator* (*Zymo Research*).

3.13. Preparación de librerías para secuenciación

Las librerías de RNA-Seq se prepararon a partir de ARN poliadenilado de tres muestras biológicas independientes por condición. La preparación de las librerías se realizó como se ha descrito en la literatura¹⁹². Las librerías de ChIP-Seq se prepararon según el protocolo descrito con anterioridad¹⁹³. Las librerías se secuenciaron durante 36 o 50 ciclos en un *Illumina Genome Analyzer II* o un *HiSeq 2000* (*Illumina*) respectivamente, según las instrucciones del fabricante. Las secuencias se procesaron en el *Illumina Pipeline* y las *tags* resultantes se alinearon frente a mm9.

3.14. Análisis de datos de secuenciación

Para RNA-Seq, se eliminaron las contaminaciones de adaptadores de las *tags* usando el *software Cutadapt*¹⁹⁴, y las secuencias resultantes se mapearon y cuantificaron en el transcriptoma (*Ensemble gene-build 65*) usando RSEM v1.17¹⁹⁵. Sólo se consideraron para el estudio estadístico aquellos genes con al menos dos cuentas por millón en al menos 4 muestras. Los datos se normalizaron y se analizó la expresión diferencial usando el paquete EdgeR de *Bioconductor*¹⁹⁶. Se consideraron como diferencialmente expresado aquellos genes con un p-valor ajustado de Benjamini-Hochberg $\leq 0,05$. Las *tags* de ChIP-Seq se mapearon en mm9 usando Bowtie2¹⁹⁷. La identificación y el análisis de los picos de ChIP-Seq se realizaron con

HOMER¹⁰³ (<http://biowhat.ucsd.edu/homer>). Se analizaron fragmentos de 4kb alrededor de los picos RXR-p65 para medir la intensidad de unión de RXR, p65 y PPAR γ . Se obtuvo el agrupamiento de dichas mediciones en clusters utilizando *Cluster 3.0* y el análisis resultante se visualizó con *Treeview (Taxonomy and Systematics)*.

3.15. Medida de nitritos y prostaglandina E₂

Un volumen determinado de sobrenadante de cultivo celular de TG-MO se mezcló con otro volumen igual del reactivo de *Griess* en placas de 96 pocillos, se agitó durante 20 min a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de placa. La medida de muestras desconocidas se interpoló en una curva estándar generada por diluciones seriadas de NaNO₂. El ensayo tiene una sensibilidad de una concentración de nitritos de 1 μ M aproximadamente. La prostaglandina E₂ se midió con el kit *Prostaglandin E₂ EIA (Cayman)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.16. Preparación de timocitos apoptóticos

Los timocitos apoptóticos (ATs en sus siglas en inglés) se generaron adaptando el protocolo descrito previamente¹⁹⁸. Los timocitos se aislaron de ratones C57BL/6J de 4 semanas. Las células se trataron con dexametasona 1 μ M (*Sigma-Aldrich*) durante 6 h a 37 °C. La eficiencia en la inducción de la apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el kit *Annexin-FITC Apoptosis Detection (BD Pharmingen)*. El tratamiento con dexametasona produjo una inducción de la apoptosis en un 70% de las células.

3.17. Citometría de flujo y cuantificación de citoquinas

Las citoquinas y quimioquinas se midieron inicialmente mediante análisis múltiple de un array de quimioquinas (*Bio-Rad*). Los factores de interés se cuantificaron mediante kits de ELISA: IL1 β , TNF β , IL12 β , IL6 y MCP1 (*BD Bioscience*); CCL9, MIP-1 α y RANTES (*R&D Systems*); GRO α (*Biosource*) y CCL6 (*Antigenix*).

Las células de medula ósea y sangre recién extraídas se analizaron por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS en sus siglas en inglés). Se emplearon el anticuerpo Alexa 488-Ly6C (ER-MP20) de SeroTec, anti-PE-CD11b (Ref. 553311) de *BD Biosciences* y los anticuerpos Alexa 647-GR-1 (RB6-8C5) y PE-Cy5-F4/80 (15-4801-80) de *eBioscience*. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS-Canto y los datos se procesaron con el programa FACSDiva (*BD Bioscience*).

3.18. Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración celular se realizaron en cámaras *Transwell* (Costar) de 8 μm de poro. Se resuspendieron monocitos/macrófagos peritoneales (5×10^4) en 150 μL de medio RPMI al 0,5% BSA y se añadieron a la cámara superior. En la cámara inferior se añadieron rCCL6 (50 ng/mL), rCCL9 (5 ng/mL) o exudado peritoneal de ratones WT o RXR α KO inyectados previamente con tioglicolato 3% (48 h). Tras 2 h de incubación a 37 °C los filtros entre ambas cámaras se procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia.

3.19. Ensayos de transmigración endotelial

Los ensayos de transmigración se realizaron en cámaras *Transwell* (Costar) de 5 μm de poro como se ha descrito previamente¹⁹⁹. Un total de 10^5 células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC en sus siglas en inglés) se plaquearon en filtros cubiertos con gelatina 1% durante 24 h y se estimularon 2 h antes del ensayo con TNF α (20 ng/mL) (*PreproTech*). Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea mediante centrifugación con gradiente de densidad (*Lympholyte*; *Cedarlane*); las células (10×10^6) se resuspendieron en 150 μL de medio RPMI al 0,5% BSA y se añadieron a la cámara superior. En la cámara inferior se añadieron MCP1 (50 ng/mL), rCCL6 (50 ng/mL), rCCL9 (5 ng/mL) o medio condicionado. Las actividades de CCL6 y CCL9 en medios condicionados o de las proteínas recombinantes se bloquearon con anticuerpos específicos contra CCL6 (16 $\mu\text{g/mL}$) y CCL9 (2 $\mu\text{g/mL}$). Las células transmigradas se recogieron en la cámara inferior y se cuantificaron.

3.20. Modelos murinos de inflamación aguda

Se inoculó 2,5 mL de medio tioglicolato al 3% (*Difco*) intraperitonealmente a ratones de entre 8 y 10 semanas. En el modelo murino de sepsis inducida con LPS se inyectaron 40mg/kg de LPS (*E.coli* O111:B4; Sigma) disuelto en suero salino en ratones de 12 semanas. La inducción de sepsis mediante ligación y punción del apéndice (CLP en sus siglas en inglés) se realizó según el protocolo descrito²⁰⁰. La severidad del CLP se evaluó mediante análisis histológico. Se tomaron secciones del hígado y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Tres observadores independientes cuantificaron a ciegas distintos parámetros en seis muestras por ratón: hemorragia, depósitos de fibrina, degeneración de hepatocitos e infiltrado leucocitario. Los ratones se consideraron severamente afectados por el CLP si sumaban más de 3 parámetros con un valor mayor que la media del grupo en cada punto temporal.

3.21. Modelo de edema en la oreja de ratón

Se aplicó acetato 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (2,5 µg) disuelto en 20 µl de acetona en dosis de 10 µl en la superficie interna y externa de la oreja derecha de ratones *Swiss* (20-25 g). Del mismo modo, se administró 9cis-RA (0,25 mg) disuelto en 20 µl de acetona 30 min antes del TPA. Las orejas izquierdas se trataron con los mismos volúmenes de acetona como control. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical tras 4 h, y se midió el peso de secciones iguales de ambas orejas. El grado de edema se calculó como el incremento en el peso de la sección de la oreja derecha con respecto a la izquierda²⁰¹. Por otro lado, se homogeneizaron secciones de las orejas en 750 µl de suero salino y se centrifugaron a 10000xg durante 15 min a 4 °C. La actividad mieloperoxidasa se midió en alícuotas del sobrenadante de los homogeneizados de las orejas tratadas con TPA mediante el método de Suzuki modificado^{202,203}. La mezcla de reacción contenía 50 µl de sobrenadante, 150 µl de buffer fosfato salino, 20 µl de NaH₂PO₄ 0,22 M, 20 µl de H₂O₂ al 0,026 % (v/v) y 20 µl de tetrametilbenzidina 18 mM en dimetilformamida acuosa al 8% (v/v). Tras 10 min de reacción a 37 °C, se añadió 30 µl de acetato sódico 1,46 M a pH de 3 y se midió la absorbancia a 620nm en un espectrofotómetro de placa.

3.22. Estadística

La distribución normal de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se realizaron análisis estadísticos utilizando el test de la *t* de Student para datos emparejados y no emparejados o el test de U de Mann-Whitney según las características de cada estudio. La tasa de supervivencia se representó como curvas de Kaplan-Meier y los resultados se analizaron mediante la prueba de Mantel-Cox.

4. RESULTADOS

RESULTADOS:

4.1. RXR α modula la respuesta inflamatoria mediante el control de la expresión de quimioquinas y genes relacionados con la fagocitosis en macrófagos

4.1.1. RXR α regula la expresión de las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9* como homodímero

El receptor RXR se ha estudiado generalmente como compañero silencioso de los heterodímeros que forma con otros RN. Poco se conoce sobre cómo regula la actividad de los heterodímeros o sobre los efectos de su actividad como homodímero. Se conoce la implicación de diversos RN en la regulación de diversas funciones relacionadas con el metabolismo y la respuesta inmune en los macrófagos. RXR podría tener también un papel en la regulación de estas actividades y ser por ello una diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades de origen inmunológico.

Para explorar el papel de RXR en la regulación de la transcripción en macrófagos, se generó un ratón transgénico con el gen de RXR α deleciónado específicamente en la línea mieloide (RXR α KO). Se empleó el sistema de recombinación Cre/Lox P para deleciónar el exón 4 de RXR α en células que expresan la lisozima M (granulocitos y monocitos/macrófagos). Mediante la técnica de *Southern blot* y PCR del ADN genómico se confirmó la deleción de RXR α (Figura 1A y B) específicamente en macrófagos peritoneales extraídos tras el tratamiento con tioglicolato (TG-M Φ) o macrófagos derivados de médula ósea (BM-M Φ) procedentes de ratones RXR α KO. Además, la pérdida del exón de RXR α deleciónado se observó mediante RT-PCR del ARN de macrófagos (Figura 1C) y la ausencia de proteína se demostró mediante *Western blot* (Figura 1D).

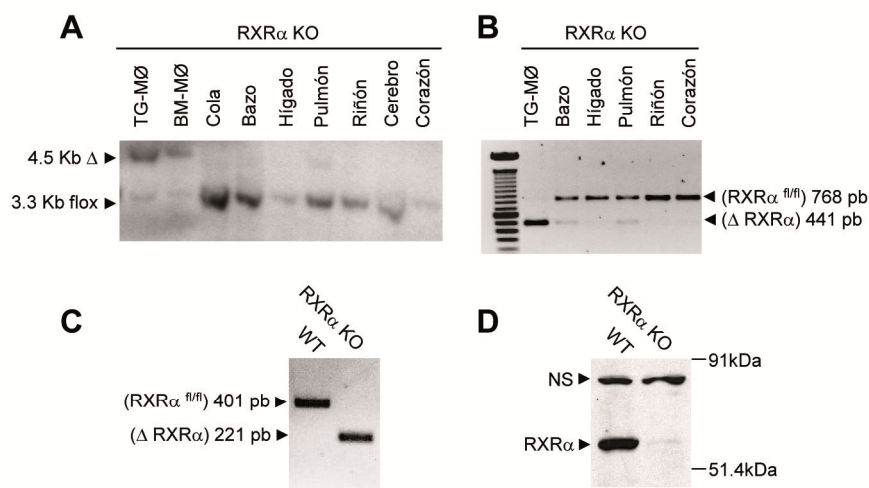


Fig 1. Generación de la estirpe de ratón RXR α KO específico de la línea mieloide. A y B. *Southern blot* (A) y análisis por PCR de ADN genómico (B) aislado de los tejidos indicados de ratones RXR α KO. TG-M Φ , macrófagos peritoneales aislados por tratamiento con tioglicolato; BM-M Φ , macrófagos derivados de médula ósea. **C.** Análisis por RT-PCR de ARN aislado de macrófagos WT y RXR α KO. Se indican los tamaños de amplicones previstos en cada caso. **D.** *Western blot* de extractos de proteína de macrófagos obtenidos de ratones WT y RXR α KO. NS, banda no específica.

Los resultados previos en nuestro laboratorio indicaban que la expresión de las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9* se reduce de manera significativa en macrófagos deficientes en RXR α ⁹⁸. Además, los ligandos de RXR inducían la expresión de estos genes en macrófagos WT y aumentaban la secreción de las proteínas CCL6 y CCL9 detectada mediante ELISA⁹⁸. Partiendo de estos datos, se profundizó en el análisis del mecanismo de regulación de *Ccl6* y *Ccl9* a nivel molecular. En el presente trabajo se analizaron los promotores de estas quimioquinas en busca de sitios conservados que pudieran contener HRE de RXR. Para ello, se realizó un alineamiento de secuencias ortólogas de los promotores proximales de estos genes para identificar secuencias conservadas (Figura 2A). Se identificaron secuencias con homología al HRE de RXR DR-1 en las regiones -67 a -54 (*Ccl6*) y -80 a -67 (*Ccl9*) de las secuencias analizadas. Para explorar la función de estos elementos se clonaron fragmentos de estos promotores que contenían el sitio DR-1 (pGL3-Ccl6 y pGL3-Ccl9) en el vector de expresión de luciferasa pGL3. Asimismo, se generaron versiones de estas construcciones que contenían mutaciones en los sitios DR-1 de los promotores aislados de *Ccl6* y *Ccl9* (pGL3-Ccl6mut y pGL3-Ccl9mut) (Figura 2B). Con ellas se evaluó la importancia de los elementos DR-1 en la regulación de estas quimioquinas. Cada construcción se co-transfectó junto con un vector de expresión de RXR α en la línea celular murina *Raw 264.7*. Las células se incubaron en presencia o ausencia del ligando de RXR, 9cis-RA. Las versiones sin mutar (*wild type*) de estos promotores respondieron al tratamiento con ligando, incrementando la actividad luciferasa; en cambio, esta respuesta fue muy reducida o inexistente en el caso de las construcciones mutadas (Figura 2C).

Las células *Raw 264.7* transfectadas con las construcciones *wild type* se incubaron con ligandos específicos de RXR, PPAR γ y LXR (9cis-RA, Rosi y T1317 respectivamente) para comprobar si la regulación de estos promotores era específica de RXR α (Figura 2D). En ausencia de RXR α exógeno no se detectó respuesta a ningún ligando; sin embargo, se produjo un incremento en la actividad luciferasa de los promotores de *Ccl6* y *Ccl9* en presencia de 9cis-RA y sobreexpresando RXR α . El resto de ligandos no tuvieron efecto en ningún caso. Estos resultados sugieren que la actividad de estos promotores depende exclusivamente de RXR.

Para probar la interacción física de los homodímeros de RXR α con los promotores de *Ccl6* y *Ccl9*, se realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética o EMSA por sus siglas en inglés (*electrophoretic mobility shift assay*). En este ensayo se utilizaron oligonucleótidos que contenían las secuencias de los sitios de unión de RXR encontrados en los promotores de *Ccl6* y *Ccl9*. Además, se

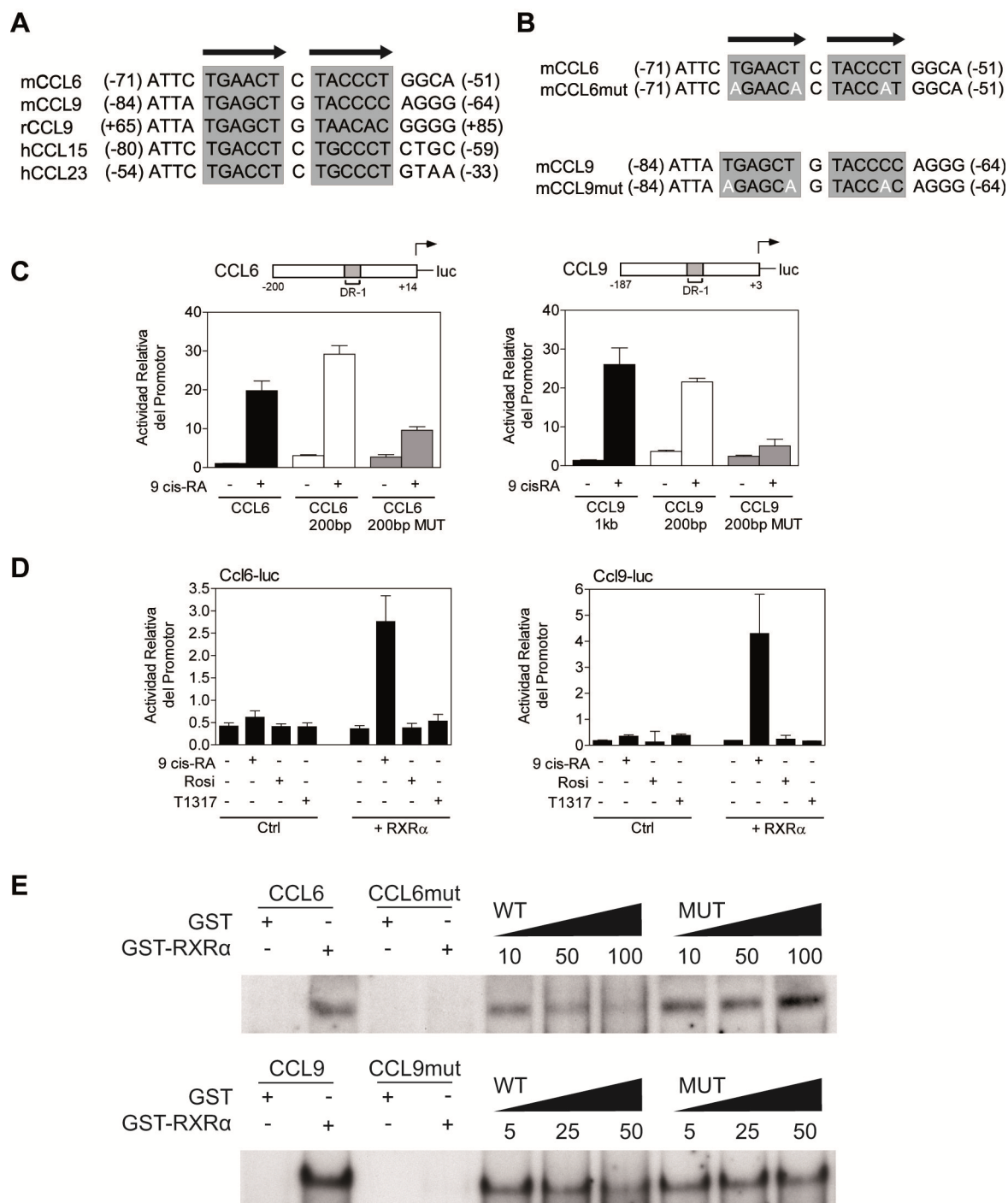


Fig 2. RXRα se une a un elemento DR-1 en los promotores de *Ccl6* y *Ccl9*. **A.** Alineamiento múltiple de secuencias del promotor de *Ccl6* y *Ccl9* y secuencias ortólogas. **B.** Localización de los elementos DR-1 de RXR en la secuencia del promotor de *Ccl6* y *Ccl9* y la posición de las mutaciones introducidas. **C.** Cotransfección de células *Raw 264.7* con plásmidos de expresión de RXRα y plásmidos reporteros de luciferasa que incluyen fragmentos de 1 kb y 200 pb *wild type* o mutado en el elemento DR-1 (MUT) de los promotores de *Ccl6* y *Ccl9*. **D.** Células *Raw 264.7* cotransfectadas con las construcciones *Ccl6-luc* y *Ccl9-luc* (200 pb de promotor) junto con el vector de expresión pCMX-hRXRα o el vector vacío pCMX (Ctrl) como se indica. Las células fueron tratadas con los ligandos de RXR (9cis-RA; 1 μM), PPARγ (Rosi; 1 μM), o LXR (T1317; 1 μM). **E.** Ensayo de EMSA en el que se visualizó la unión *in vitro* entre RXR recombinante fusionado con GST y los oligonucleótidos con la secuencia DR-1 mostrada en A marcados con P³². Para el ensayo de competición se emplearon versiones *wild type* o mutadas del oligonucleótidos sin marcaje radiactivo.

generaron versiones mutadas de estos oligonucleótidos cambiando su secuencia en ciertos nucleótidos clave para la unión de RXR. Estos oligonucleótidos marcados radiactivamente se incubaron *in vitro* en presencia de GST-RXR α , purificado mediante el sistema Glutación S-Transferasa a partir de bacterias recombinantes. Como se muestra en la Figura 2E, las versiones *wild type* de los oligonucleótidos migraron en asociación con la banda GST-RXR α , mientras que no se observó marcaje en GST-RXR α cuando se emplearon los oligonucleótidos mutados. Cuando se añadió un competidor no marcado durante la incubación con el oligonucleótido *wild type* radiactivo, se observó cómo el marcaje de la banda GST-RXR α desaparecía progresivamente según se incrementaba la cantidad de oligonucleótido competidor no marcado. Sin embargo, la competencia por la unión a GST-RXR α no se detectó cuando en lugar del oligonucleótido *wild type* se añadió su equivalente mutado sin marcar. Estos resultados indican que RXR α se une específicamente al sitio de unión DR-1 presente en los promotores de *Ccl6* y *Ccl9* sin necesidad de heterodimerizar con otros RN.

Para comprobar la especificidad de la regulación de *Ccl6* y *Ccl9* por RXR se realizó un ensayo para antagonizar la actividad de homodímeros de RXR. Se incubaron macrófagos peritoneales con ligandos de RXR (9cis-RA y LG268) en presencia o ausencia del antagonista LG754, que inhibe las funciones de homodímeros de RXR³⁰⁻³². El tratamiento con los ligandos de RXR produjo un aumento en la expresión de *Ccl6* y *Ccl9*. Sin embargo, la presencia de LG754 redujo significativamente los niveles de ARN inducidos por LG268 y 9cis-RA (Figura 3A). Por otro lado, se exploró el papel de los RN PPAR que también se unen a DR-1 en la regulación de *Ccl6* y *Ccl9*. Para ello, se trataron macrófagos con ligandos de PPAR α (GW647), PPAR δ (GW742), PPAR γ (Rosi) y RXR (LG268) (Figura 3B). Se midieron los cambios en la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* en las distintas condiciones de tratamiento con ligandos. Ambos genes sólo se indujeron en presencia de LG268, y su expresión no se incrementó con otros tratamientos. Sin embargo, *Abcg1* y *Adrp*, genes diana de PPAR, sí respondieron a los ligandos específicos de estos receptores (Figura 3C). En conjunto, estos datos sugieren que *Ccl6* y *Ccl9* no están regulados por PPAR γ a pesar de contener un elemento DR-1 en sus promotores y que RXR los regula a nivel transcripcional como homodímero.

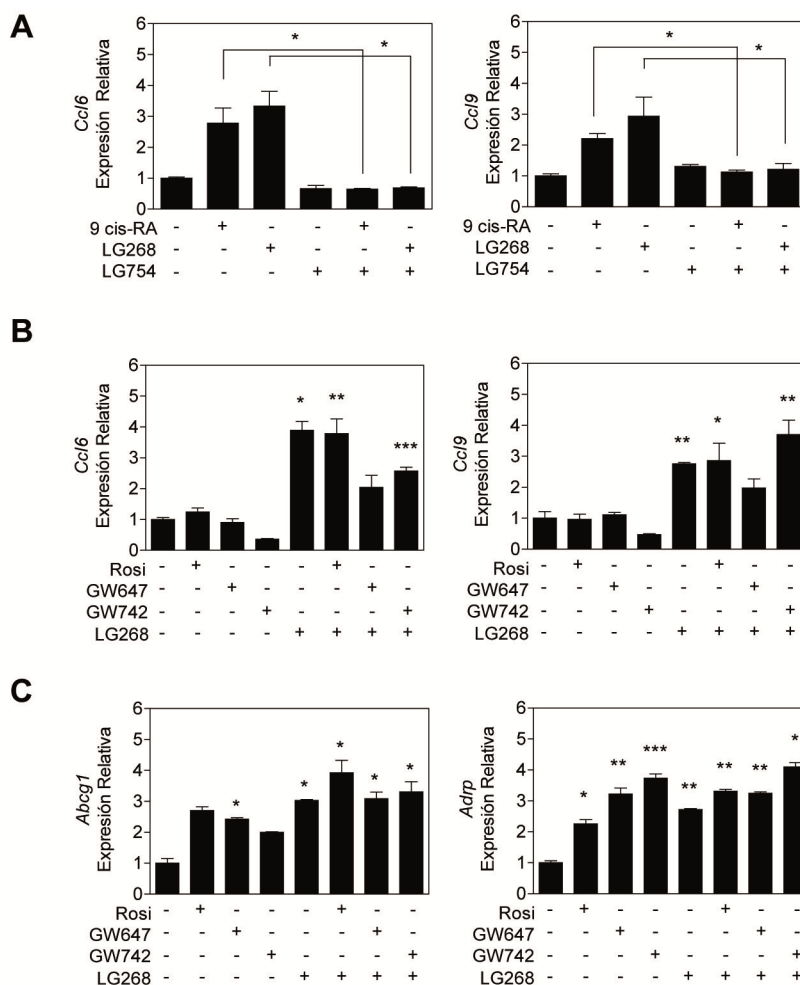


Fig 3. El homodímero de RXR regula la transcripción de *Ccl6* y *Ccl9*. **A.** Medida de la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* mediante qPCR en macrófagos peritoneales tratados con ligandos de RXR (9cis-RA, LG268; 10 nM) en ausencia o presencia de un antagonista de homodímeros de RXR (LG754, 1 μ M) de RXR, por separado o en combinación. Las células fueron tratadas durante 24 h. **B y C.** Niveles de expresión de *Ccl6*, *Ccl9*, *Abcg1* y *Adrp* medidos por qPCR en macrófagos peritoneales en respuesta a ligandos de PPAR α (GW647; 100 nM), PPAR δ (GW0742; 100 nM), PPAR γ (Rosi; 1 μ M) en ausencia o presencia del ligando de RXR (LG268; 50 nM). Los valores son media \pm SEM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; prueba *t-Student* pareada.

4.1.2. Los macrófagos no requieren de PPAR γ para expresar *Ccl6* y *Ccl9* y regular la migración leucocitaria

Ccl6 y *Ccl9* son quimioquinas importantes en la migración leucocitaria a focos de inflamación. La reducción de la expresión de estas proteínas en macrófagos RXR α KO podría afectar a la capacidad de respuesta del organismo a una infección o proceso inflamatorio. Previamente en nuestro laboratorio, se exploró la respuesta leucocitaria de los ratones RXR α KO en un modelo de peritonitis inducida por inyección intraperitoneal de tioglicolato. El tioglicolato es una sustancia irritante que,

una vez introducido en el peritoneo del animal, induce una potente migración leucocitaria sin que intervengan agentes infecciosos (peritonitis aséptica). El análisis por citometría de flujo de los exudados peritoneales de este modelo de inflamación aguda aséptica mostró una migración leucocitaria reducida en los ratones RXR α KO, en comparación con los ratones WT⁹⁸. En lavados peritoneales recogidos de ratones RXR α KO se detectaron niveles de CCL6 y CCL9 inferiores a los encontrados en ratones WT mediante ELISA⁹⁸. Estos resultados sugerían que CCL6 y CCL9 estaban controlados por RXR α *in vivo*, y que los cambios en su expresión tenían efecto en la migración leucocitaria.

Teniendo en cuenta estos datos previos, se decidió explorar el papel de PPAR γ en el modelo *in vivo* de peritonitis inducida por tioglicolato. Al igual que RXR, el RN PPAR γ se une a elementos DR-1 como heterodímero con RXR α para activar la transcripción. Para descartar que los defectos en la migración leucocitaria *in vivo* en ratones RXR α KO se debieran a un defecto en la señalización a través de PPAR γ se analizó la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* en macrófagos de ratones deficientes en PPAR γ en la línea mieloide (PPAR γ KO)¹⁸⁸. En macrófagos peritoneales en cultivo se confirmó que la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* no se induce en respuesta al ligando de PPAR γ Rosi, no se observaron diferencias en la expresión basal de estas quimioquinas entre células WT y PPAR γ KO, ni tampoco en la respuesta a LG268 o Rosi. Por el contrario, se apreció un descenso significativo en la expresión de *Cd36* (gen diana de PPAR γ) en células PPAR γ KO (Figura 4A), tanto en estado basal como en la respuesta a ligandos. Los niveles de leucocitos peritoneales no presentaron diferencias entre los genotipos WT y PPAR γ KO (Figura 4B). También se realizó un ensayo de peritonitis con tioglicolato, y en contraste con los resultados obtenidos en ratones RXR α KO, los ratones PPAR γ KO no mostraron defecto en migración leucocitaria a peritoneo comparado con los WT (Figura 4B y C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de CCL6, CCL9, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1) o IL6 en el exudado peritoneal obtenido de ratones PPAR γ KO respecto de los WT (Figura 4D). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el papel de RXR en la producción de CCL6 y CCL9 es independiente de PPAR γ .

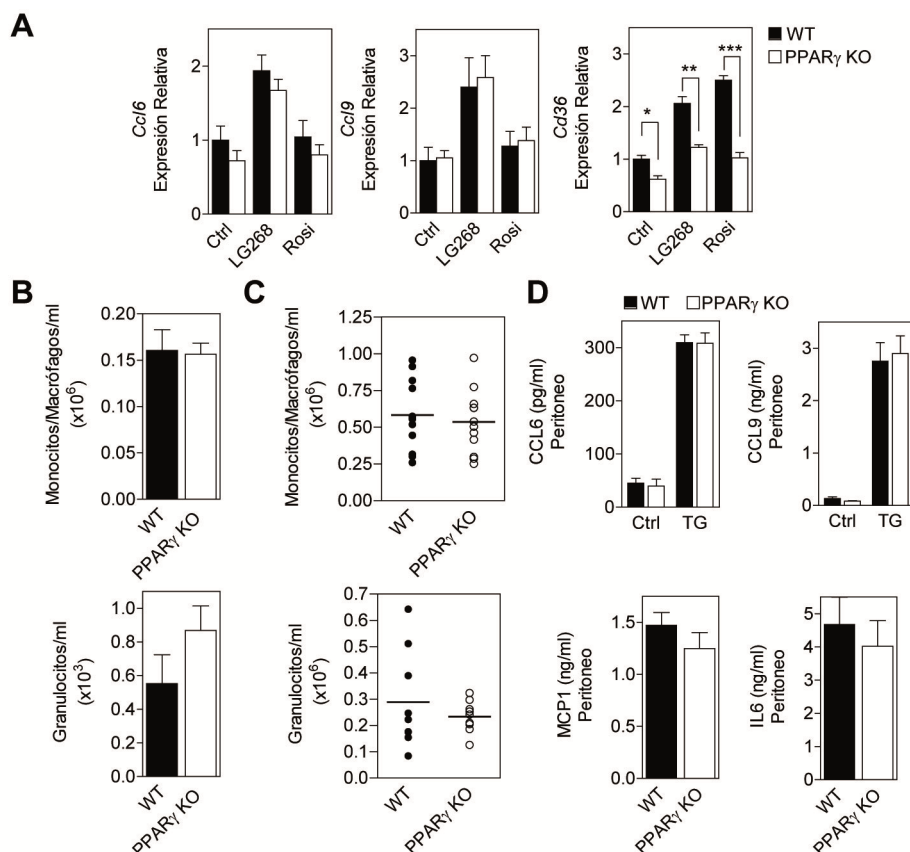


Fig 4. Migración leucocitaria y expresión de *Ccl6* y *Ccl9* en macrófagos PPAR γ KO. **A.** Expresión de *Ccl6* y *Ccl9* medida mediante qPCR en macrófagos peritoneales de ratones WT y PPAR γ KO. La expresión de *Cd36* se utilizó como control. Los valores son medias \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; prueba *t-Student* pareada. **B.** Análisis por FACS del número total de monocitos/macrófagos y granulocitos residentes recuperados de lavados peritoneales de ratones WT y PPAR γ KO; n = 5-8 ratones por genotipo. Los datos muestran medias \pm SEM. Prueba U de Mann-Whitney. **C.** Análisis por FACS del número total de monocitos/macrófagos y granulocitos recuperados 48 h y 24 h respectivamente de lavados peritoneales realizados después de la inyección intraperitoneal de tioglicolato; n = 9-12 ratones por genotipo. Prueba U de Mann-Whitney. **D.** Niveles de CCL6 y CCL9 (48 h), MCP1 y IL6 (4 h) en exudados peritoneales recogidos de ratones WT y PPAR γ KO tras el tratamiento con tioglicolato; n = 5-6 ratones por genotipo. Los valores son medias \pm SEM. Prueba *t-Student* pareada.

4.1.3. Los macrófagos RXR α KO conservan la sensibilidad a estímulos quimioatrayentes como CCL6 y CCL9

Para comprobar la capacidad quimioatrayente de CCL6 y CCL9 se realizaron ensayos de migración de macrófagos *in vitro*. Se utilizó como estímulo el exudado peritoneal de ratones WT y RXR α KO tratados con tioglicolato (Figura 5A). Los exudados de ratones WT estimularon la migración de macrófagos de modo similar a como lo hicieron las formas recombinantes de CCL6 y CCL9; sin embargo, los exudados de ratones RXR α KO indujeron significativamente menos quimiotaxis. A continuación, se probó el potencial quimioatrayente de los sobrenadantes procedentes de cultivos de macrófagos peritoneales mantenidos en presencia de los ligandos de RXR LG268 y 9cis-RA durante 72 h. Estos medios condicionados incrementaron la

migración de células mononucleares de médula ósea a través de células endotelio activado (Figura 5B). La preincubación de estos medios con anticuerpos frente a CCL6 y CCL9 redujo significativamente su capacidad quimiotrayente, lo que indica la importancia de estas quimioquinas en la trans migración en este tipo de ensayos.

Para descartar que la reducción en la migración leucocitaria observada *in vivo* en ratones RXR α KO se debiera a cambios en la sensibilidad de las células a señales quimiotácticas, se realizaron ensayos de trans migración empleando células WT y RXR α KO (Figura 5C). Las células se incubaron en presencia de CCL6 y CCL9 recombinantes y se utilizó el factor quimiotáctico MCP1 como control positivo. Las células mononucleares de medula ósea de ambos genotipos migraron de manera similar en respuesta a cada estímulo (Figura 5C). Por otro lado, no se encontraron diferencias entre WT y RXR α KO en los niveles de expresión de *Ccr1* (receptor de CCL6 y CCL9) (Figura 5D). Estos resultados confirman la capacidad quimioatrayente

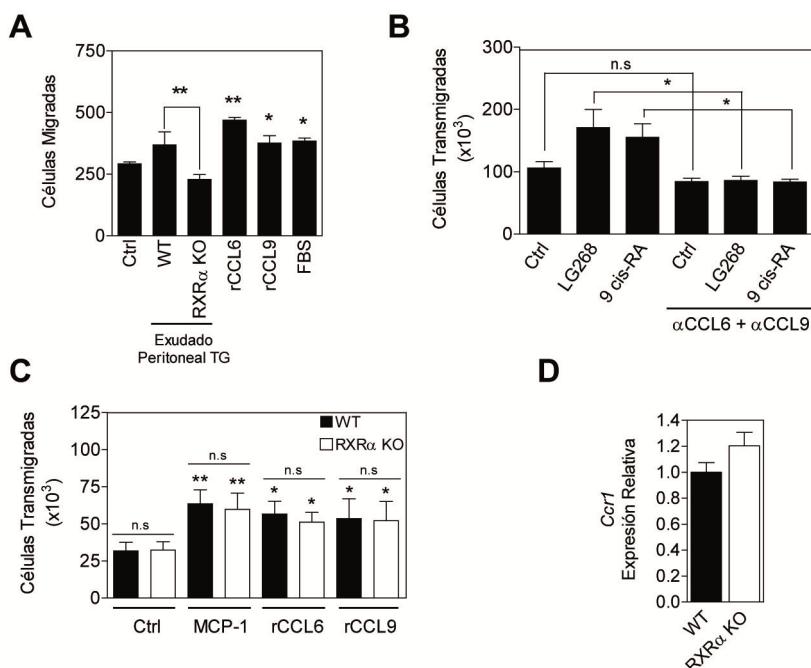


Fig 5. Control de la migración celular dependiente de *Ccl6* y *Ccl9* en ausencia de RXR α . **A.** Quimiotaxis de monocitos/macrófagos peritoneales en respuesta a proteínas recombinantes de CCL6 (rCCL6, 50 ng/mL) y CCL9 (rCCL9, 5 ng/mL), FBS o exudados peritoneales de ratones WT y RXR α KO tratados con tioglicolato (TG). Cada condición se realizó por duplicado en tres experimentos independientes. Los datos son medias \pm SEM. **B.** Trans migración de células mononucleares de médula ósea a través de una monocapa de células endoteliales humanas activadas en respuesta a medio condicionado de macrófagos WT tratados con LG268 (50 nM) o 9cis-RA (1 μ M) durante 72 h. Se añadieron anticuerpos anti-CCL6 (16 μ g/mL) y anti-CCL9 (2 μ g/mL) al medio condicionado como se indica. Los datos representan el número total de células recogidas en la cámara inferior de una placa *transwell* medidos en tres experimentos independientes. Los valores son medias \pm SEM. **C.** Trans migración de células mononucleares de médula ósea de ratones WT y RXR α KO a través de una monocapa de células endoteliales humanas activadas en respuesta al quimioatrayente MCP1, rCCL6 o rCCL9. **D.** Expresión de *Ccr1* en macrófagos peritoneales de ratones WT y RXR α KO. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; prueba *t-Student* pareada.

de CCL6 y CCL9, y descartan un defecto en la sensibilidad a quimioatrayentes que podría explicar el déficit en la migración leucocitaria observado en ratones RXR α KO.

4.1.4. La ausencia de RXR α en macrófagos incrementa la supervivencia de ratones en modelos de sepsis

RXR tiene un papel importante en procesos de inflamación aguda en modelos de peritonitis aséptica inducida por tioglicolato a través del control de *Ccl6* y *Ccl9*⁹⁸. Sin embargo, la peritonitis suele producirse como respuesta a una infección bacteriana que, cuando se extiende en el organismo, provoca un proceso de sepsis que puede llegar a ser mortal.

Para emular la peritonitis bacteriana se inyectó intraperitonealmente el inmunógeno LPS de *Escherichia coli* en ratones RXR α KO. Estos animales mostraron mayor resistencia al shock séptico inducido por LPS que los controles WT (Figura 6A). Tras 90 min de inoculación se midieron niveles menores de CCL9 en plasma de ratones RXR α KO que en WT (Figura 6B). Sin embargo, otras citoquinas como IL6, la interleuquina 12 (IL12), la interleuquina 1 α (IL1 α), TNF α y MCP1 no mostraron cambios significativos (Figura 6C). En macrófagos WT en cultivo se confirmó que *Ccl6* no se induce en respuesta a LPS (Figura 6D). El estudio *in vitro* de la inducción de *Ccl9* por LPS mostró que en macrófagos RXR α KO se producen niveles inferiores de ARN y de proteína que los WT a diferentes tiempos (Figura 6E). Asimismo, se pudo comprobar que en macrófagos WT el tratamiento con 9cis-RA o LG268 junto con LPS induce aún más la expresión de *Ccl9* que con LPS sólo; mientras que los macrófagos RXR α KO muestran niveles de expresión inferiores a los WT (Figura 6F). Para descartar el papel del heterodímero de PPAR γ se midió la expresión de *Ccl9* en macrófagos PPAR γ KO estimulados con LPS observándose una regulación similar a la que se produjo en células WT (Figura 6G). La cantidad de esta quimioquina medida en plasma de ratones PPAR γ KO sometidos al tratamiento con LPS intraperitoneal no sufrió cambios respecto a los ratones WT. Tampoco se observaron cambios en otras quimioquinas como MCP1 o IL6 (Figura 6H).

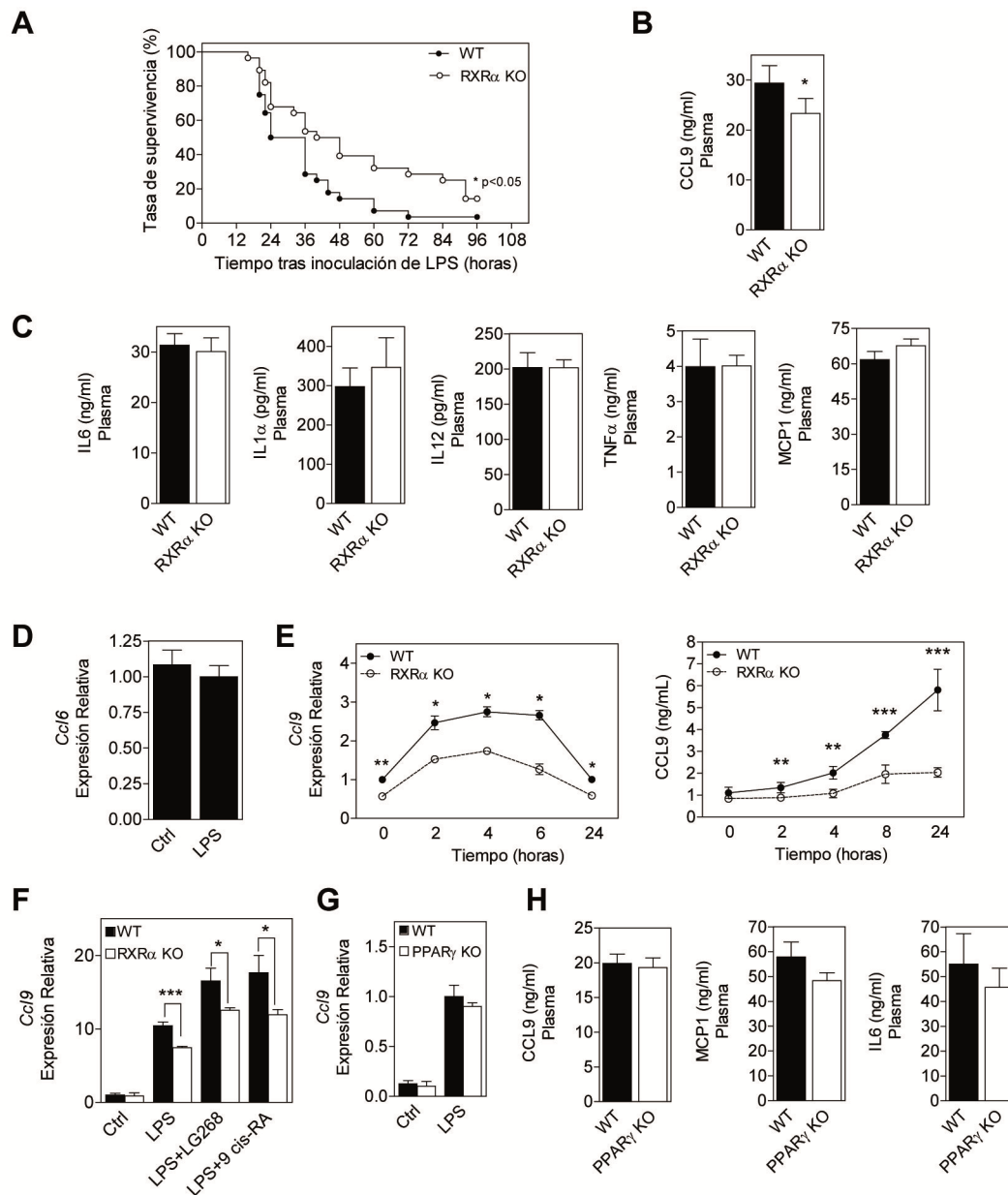


Fig 6. Los ratones RXR α KO tienen mayor resistencia al shock séptico por LPS y tienen déficit de CCL9 comparado con ratones WT. **A.** Supervivencia de ratones WT y RXR α KO tras inyección intraperitoneal con LPS (40 mg/kg por ratón). n = 28 ratones por genotipo en tres experimentos independientes. Prueba de Mantel-Cox. **B y C.** Concentración de CCL9 y otras citoquinas en plasma de ratones WT y RXR α KO, determinado mediante ELISA 90 min después del tratamiento con LPS. n = 7 ratones por genotipo. **D.** Expresión de *Ccl6* medida por qPCR en macrófagos estimulados con LPS (100 ng/mL). **E.** Niveles de ARN y **D.** proteína de CCL9 en macrófagos WT y RXR α KO estimulados *in vitro* con LPS (100 ng/mL) entre 0 h hasta 24 h. **F.** Expresión de *Ccl9* en macrófagos WT y RXR α KO tratados *in vitro* con LPS (100 ng/mL) en ausencia o presencia de ligandos de RXR (1 μ M). 18h de tratamiento con ligando seguido de 6 h con LPS. **G.** Expresión de *Ccl9* en macrófagos WT y PPAR γ KO tratados con LPS. **H.** Niveles de CCL9, MCP1 y IL6 en plasma de ratones WT y PPAR γ KO. Los valores son medias \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; prueba *t-Student*.

Se continuó el estudio de la respuesta a sepsis empleando un modelo de peritonitis por infección multibacteriana mediante ligación y punción del apéndice cecal (CLP, en sus siglas en inglés). En este modelo animal se liberan en el peritoneo las bacterias contenidas en el apéndice cecal de los ratones, lo que provoca una respuesta inflamatoria local que posteriormente se extiende al resto del organismo. Los ratones RXR α KO resistieron mejor la infección y su supervivencia fue mayor a la de ratones WT (Figura 7A). En este sentido, los daños en el hígado medidos según parámetros histológicos (hemorragia, acumulación de fibrina, infiltrado inflamatorio y degeneración tisular) fueron más severos en animales WT que en RXR α KO (Figura 7B y C). Pasadas 24 h se midieron diferentes citoquinas en el exudado peritoneal y en plasma de estos ratones. Los niveles de CCL6 y CCL9 en plasma y CCL6 en exudado peritoneal fueron inferiores en los ratones KO respecto de los WT (Figura 7D). En cambio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de CCL9 en los exudados. Los niveles de otras quimioquinas como MCP1, GRO α , la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP1 α), RANTES, IL12, IL6 y TNF α en el exudado peritoneal fueron similares entre ratones de ambos genotipos (Figura 7E). Sin embargo, en plasma los niveles de MCP1 de ratones KO fueron inferiores al WT mientras que otras quimioquinas como IL6, IL1 α o IL12 permanecieron inalteradas (Figura 7F). En resumen, estos resultados describen un efecto protector de la ausencia de RXR α en macrófagos en modelos de sepsis que se correlaciona con un descenso en los niveles de CCL6 y/o CCL9 *in vivo*.

4.1.5. La ausencia de RXR α o PPAR γ reduce la respuesta anti-inflamatoria de los macrófagos en presencia de células apoptóticas

Tras un proceso inflamatorio, el sistema inmune debe frenar la respuesta celular y humoral para restablecer el estado fisiológico normal del organismo. Si no se recupera el equilibrio homeostático, la inflamación puede convertirse en una patología crónica. En el transcurso de la inflamación diversas células entran en apoptosis y posteriormente son fagocitadas por los macrófagos. La ingesta de estas partículas apoptóticas provoca un cambio en los macrófagos presentes en el foco de inflamación, los cuales adquieren un fenotipo anti-inflamatorio y comienzan la liberación de factores que inician la resolución de la inflamación.

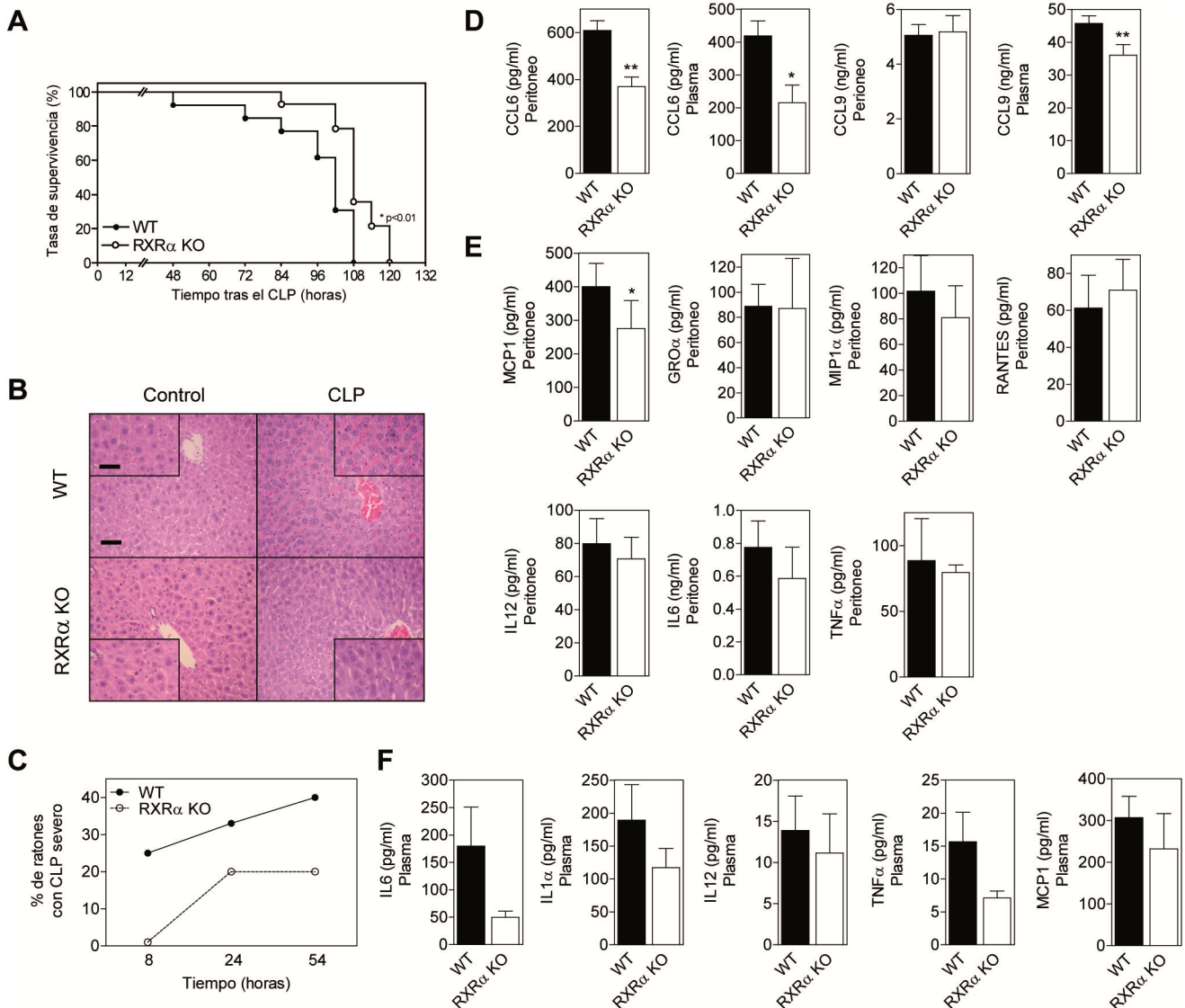


Fig 7. La supervivencia la sepsis inducida por CLP es mayor en los ratones RXR α KO y se asocia a un descenso en los niveles de CCL6 y CCL9. **A.** Tasa de supervivencia de ratones hembra WT y RXR α KO en los que se realizó CLP. Se representaron datos de dos experimentos independientes. En cada experimento, n = 14 ratones por genotipo. Se realizó un seguimiento de la supervivencia durante los 7 siguientes a la cirugía. Prueba de Mantel-Cox. **B.** Análisis histológico de cortes de hígado teñido con hematoxilina-eosina de ratones WT y RXR α KO 54 h después del CLP. Se muestran cortes histológicos representativos del total (Escala de la barra: 50 μ m, en ampliaciones 15 μ m). **C.** Porcentaje de ratones con peritonitis severa tras CLP, determinado mediante cuantificación de parámetros histológicos (hemorragia, acumulación de fibrina, infiltrado inflamatorio y degeneración tisular). n = 5-9. **D.** Niveles reducidos de CCL6 y CCL9 en exudados de peritoneo y en plasma de ratones RXR α KO comparado con ratones WT medidos por ELISA en muestras recogidas 24 h después de CLP. n = 7-10 animales por genotipo. **E-F.** Citoquinas proinflamatorias medidas en las muestras de exudado peritoneal (E) y plasma (F) de las muestras utilizadas en D. Los valores son medias \pm SEM. *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; prueba *t-Student*.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que los macrófagos deficientes en RXR α o PPAR γ fagocitan restos de células apoptóticas de manera menos eficiente que los macrófagos WT¹⁸⁰. Para comprobar las consecuencias que tiene este defecto en la fagocitosis sobre el cambio de fenotipo del macrófago, se incubaron macrófagos WT, RXR α KO y PPAR γ KO en presencia o ausencia de timocitos apoptóticos (ATs). Estos ATs se obtuvieron siguiendo un protocolo descrito¹⁹⁸ en el que se incuban timocitos en un medio suplementado con dexametasona y se comprueba la entrada en apoptosis mediante citometría de flujo (Figura 8A). Se analizó la expresión de factores anti-inflamatorios como *Tgfb1* o *Il10* y el marcador de superficie *Mrc1* en los macrófagos y se observó cómo éstos se inducían por la presencia de ATs en células WT mientras que su expresión no sufrió cambios en RXR α KO ni PPAR γ KO. El gen *Slam* se indujo significativamente menos en los macrófagos KO comparado con los WT (Figura 8B).

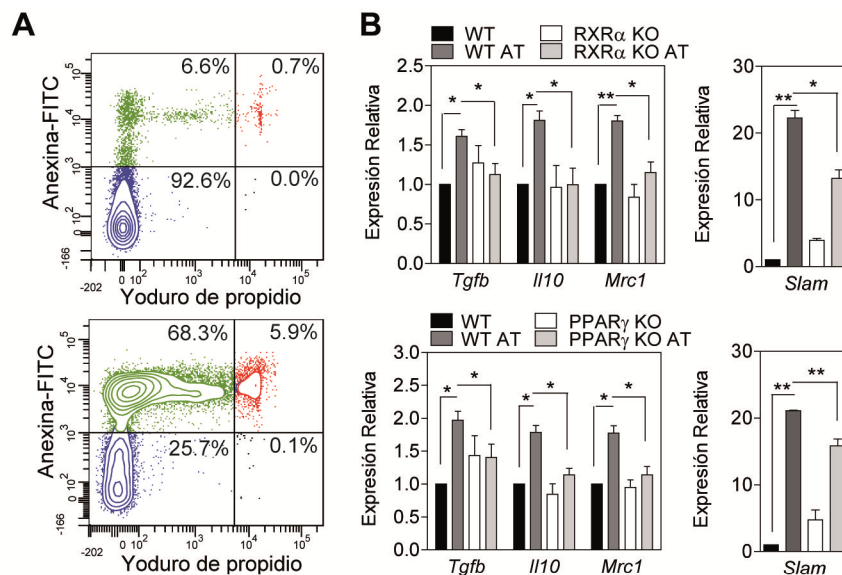


Fig 8. Defecto en el programa anti-inflamatorio inducido por células apoptóticas en macrófagos RXR α KO y PPAR γ KO. **A.** Porcentaje de timocitos apoptóticos (ATs) en ausencia de tratamiento (Arriba) y tras 6 h de tratamiento con dexametasona 1 μ M (Abajo) determinado mediante citometría de flujo de timocitos en cultivo utilizando el método Annexina-FITC con yoduro de propidio. Verde: ATs; Rojo: ATs tardías; Azul: timocitos no apoptóticos. **B.** Expresión de *Tgfb*, *Il10*, *Mrc1* y *Slam* medida mediante qPCR en macrófagos WT, RXR α KO y PPAR γ KO incubados 24 h en ausencia o presencia de ATs. Datos normalizados frente al valor WT en ausencia de ATs. Los valores son medias \pm SEM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; prueba *t-Student* pareada.

Para probar el papel de RXR α y PPAR γ en la regulación de genes pro-inflamatorios, se analizaron macrófagos WT, RXR α KO o PPAR γ KO estimulados con LPS en presencia o ausencia de ATs. La transcripción de la interleuquina 12 β (*Il12 β*), la interleuquina 1 β (*Il1 β*), óxido nítrico sintasa inducible (*Nos2*), y *Tnf α* se activó en respuesta a LPS y se reprimió significativamente en presencia de ATs en macrófagos WT (Figura 9A). Sin embargo, la presencia de ATs no produjo cambios en la expresión

de estos genes pro-inflamatorios en macrófagos RXR α KO o PPAR γ KO. La secreción de citoquinas se midió en el sobrenadante de estas células y se confirmó que en presencia de ATs se produce un descenso de los niveles de IL12 β , IL6 y TNF α producidos por macrófagos WT mientras que no se producen cambios significativos en macrófagos RXR α KO o PPAR γ KO (Figura 9B). Estos resultados indican que RXR α y PPAR γ son importantes reguladores de la etapa de resolución de la inflamación, ya que están implicados en el cambio de fenotipo del macrófago provocado por células apoptóticas.

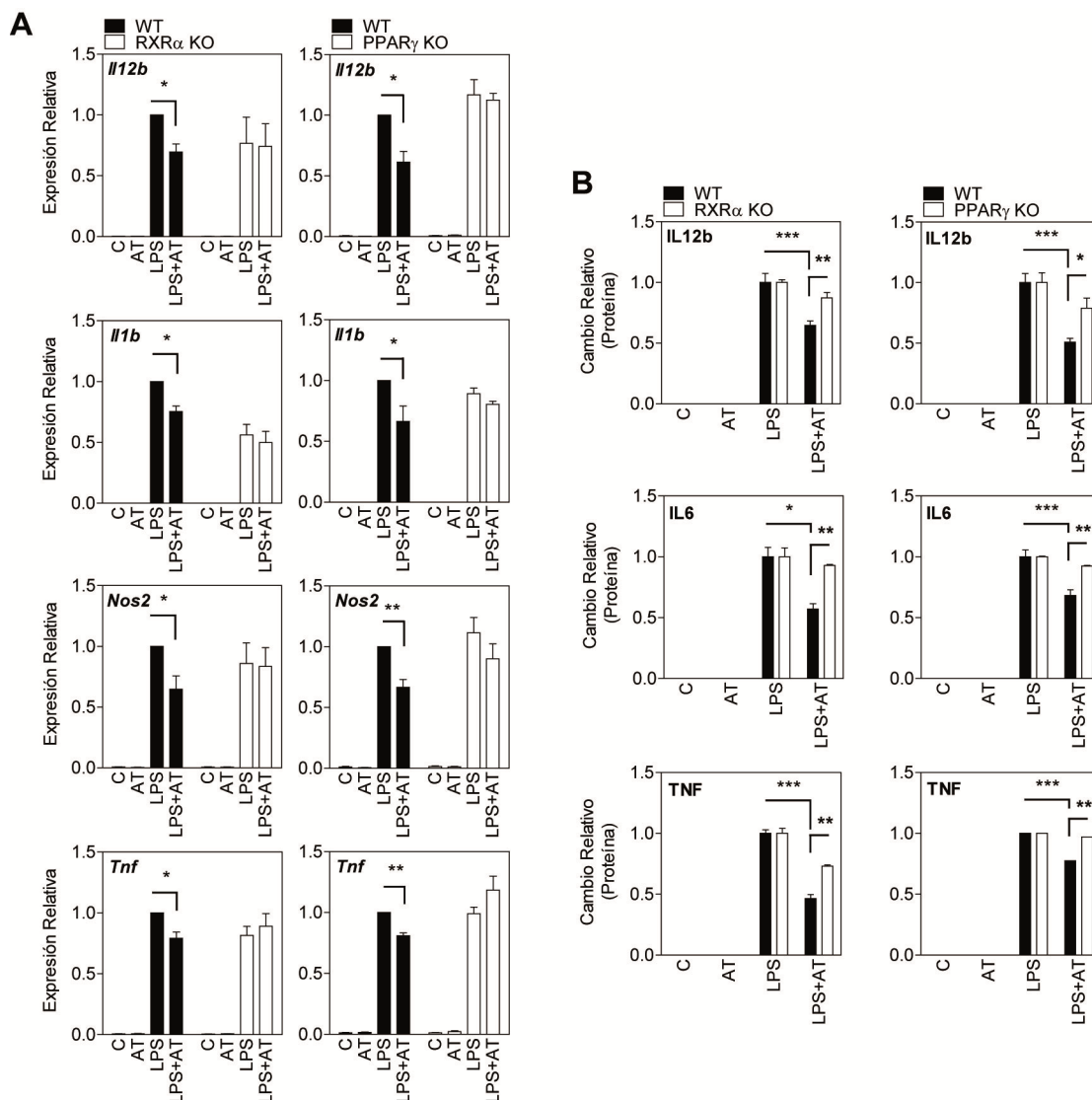


Fig 9. La incorporación de células apoptóticas provoca la inhibición del programa inflamatorio en macrófagos por un mecanismo dependiente de RXR α y PPAR γ . **A.** Expresión de genes pro-inflamatorios en macrófagos peritoneales WT, RXR α KO y PPAR γ KO preincubados con ATs durante 30 min y estimulados posteriormente con LPS (100 ng/mL) durante 5 h. Datos normalizados frente al nivel de expresión en células tratadas con LPS. **B.** Niveles de citoquinas pro-inflamatorias medidas mediante ELISA en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales WT, RXR α KO y PPAR γ KO preincubados con ATs durante 30min y estimulados con LPS (100 ng/mL) durante 18 h. Datos normalizados frente al nivel de expresión en células tratadas con LPS. Los valores son medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; prueba *t-Student* pareada.

4.1.6. Las células apoptóticas estimulan la expresión de genes relacionados con la fagocitosis mediante un mecanismo dependiente de RXR α y PPAR γ

En un estudio previo de nuestro laboratorio¹⁸⁹ se identificó un grupo de receptores y opsoninas relacionados con fagocitosis que se expresan significativamente menos en macrófagos PPAR γ KO. PPAR γ heterodimeriza con RXR para regular la transcripción y por ello puede ser activado, a través de este receptor, en respuesta a ligandos de RXR. La fagocitosis de partículas apoptóticas libera en el interior del macrófago diversas moléculas procedentes de los componentes celulares, entre ellos colesterol y ácidos grasos, que pueden actuar como ligandos endógenos de RXR α o PPAR γ . Estos lípidos podrían activar a estos receptores, facilitando de este modo la expresión de genes necesarios para la fagocitosis de las partículas apoptóticas. Para comprobar esta hipótesis, se analizó el papel de RXR α y PPAR γ en la regulación dependiente de ATs de genes implicados en la fagocitosis. Para ello, se incubaron macrófagos WT, RXR α KO o PPAR γ KO en presencia o ausencia de ATs. La ingesta de ATs produjo la inducción de la expresión de los genes *Cd36*, el receptor tirosina quinasa c-mer (*Mertk*), *Axl*, el receptor de Fc γ I (*Fcgr1*), *C1qa*, *C1qb*, *C1qc* y la transglutaminasa 2 (*Tgm2*) en macrófagos WT, mientras que no se observaron cambios en células RXR α KO o PPAR γ KO (Figura 10A y B). La pérdida de expresión de estos genes se correlaciona con el defecto en la fagocitosis de ATs observado en macrófagos RXR α KO y PPAR γ KO, en trabajos previos en nuestro laboratorio¹⁸⁰. La ineficiente fagocitosis de ATs dificulta el cambio de los macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio y favorece la acumulación de cuerpos apoptóticos. El aumento de cuerpos apoptóticos puede causar que estos sean reconocidos por el sistema inmune adaptativo y se produzca una pérdida de la autotolerancia inmunológica. Por tanto, RXR y PPAR forman parte de un mecanismo de control de la homeostasis, que actúa en la resolución de la respuesta inmune innata y favorece el correcto funcionamiento de la respuesta inmune adaptativa.

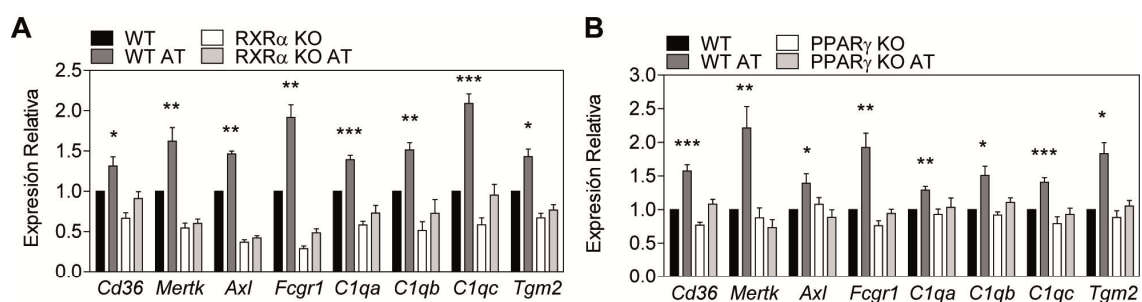


Fig 10. La fagocitosis de partículas apoptóticas induce la expresión de receptores y opsoninas a través de RXR α y PPAR γ en macrófagos. A y B. Expresión de los genes *Cd36*, *Mertk*, *Axl*, *Fcgr1*, *C1qa*, *C1qb*, *C1qc* y *Tgm2* en macrófagos WT, RXR α KO y PPAR γ KO incubados durante 24 h con ATs (5:1 ATs/macrófago) o sin ATs. El nivel de expresión se normalizó frente al valor en ausencia de ATs en células WT. Los valores son medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ prueba *t-Student* pareada con respecto a células del mismo genotipo sin tratamiento.

RESULTADOS:

4.2. RXR reprime la respuesta inflamatoria mediante el mecanismo de transrepresión

4.2.1. Los ligandos de RXR inhiben la inducción de genes pro-inflamatorios en macrófagos

Se desconoce el mecanismo molecular por el que RXR α y PPAR γ intervienen en la inhibición de la inflamación dependiente de ATs. Muchos de los genes inducidos durante la inflamación dependen de la activación del factor de transcripción NF κ B. Es probable que PPAR γ inhiba la actividad de este factor de transcripción mediante el mecanismo conocido como transrepresión⁵³. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún mecanismo molecular por el que RXR α inhiba la transcripción de genes dependiente de otros factores de transcripción.

Para explorar los efectos de RXR sobre la expresión de genes diana de NF κ B se utilizó como modelo la activación de macrófagos peritoneales murinos con LPS. Este inmunógeno se une al receptor de membrana TLR4, presente en los macrófagos, y activa la vía de señalización de NF κ B entre otras. Esto provoca la inducción de la expresión de un número significativo de genes específicos con diversas funciones inmunológicas. Los macrófagos se incubaron en presencia o ausencia de los ligandos de RXR, 9cis-RA y LG268. Posteriormente, se estimularon con LPS para inducir la expresión de los genes pro-inflamatorios. Se estudiaron los cambios en la expresión y en la actividad de los genes diana de NF κ B: *Nos2* y ciclooxygenasa-2 (*Ptgs2* también denominada *Cox2*). Como se observa en la Figura 11A, estos genes se indujeron en respuesta a LPS. Sin embargo, su expresión disminuyó cuando los macrófagos se estimularon en presencia de ligandos de RXR. Además, se midieron los niveles de nitritos y prostaglandina E₂ (dependientes de *Nos2* y *Cox2* respectivamente) acumulados en el sobrenadante de las células tratadas (Figura 11B). Se comprobó que los cambios en la transcripción de *Nos2* y *Cox2* provocaron una reducción de los niveles de estos productos enzimáticos que fue mayor cuando se aumentó la dosis de ligando.

Para profundizar en el efecto de RXR sobre la expresión de otros genes inducibles por LPS se utilizaron tarjetas microfluídicas (*Applied Biosystems*), que permiten cuantificar por qPCR la expresión de diversos genes. Los genes analizados fueron aquellos inducidos por LPS y reprimidos por alguno de los ligandos de RXR (Figura 11C). Se confirmó la represión de los genes *Nos2* y *Cox2* y se encontraron regulados negativamente citoquinas relevantes en la inflamación como la *Il1 β* , la *Il6*, el *Tnf α* , el *Ccl2* (*Mcp1*) y el *Ccl3* (*Mip1 α*). LG268 y 9cis-RA reprimieron la mayoría de genes analizados, aunque 9cis-RA indujo la expresión de alguno de ellos. 9cis-RA es un ligando tanto de RXR como de RAR, mientras que LG268 sólo activa a RXR. Por tanto, las diferencias encontradas entre ambos tratamientos pueden deberse a efectos

asociados a RAR. Para evitar la activación de RAR, se utilizó el ligando LG268 para continuar con el estudio de las funciones de RXR.

En conjunto, estos datos sugieren que la activación específica de RXR tiene un efecto represor sobre la expresión de genes diana de NFκB. Sin embargo, no se puede descartar la intervención de otros RN que suelen heterodimerizar con RXR y que podrían actuar en respuesta a LG268 como heterodímeros permisivos.

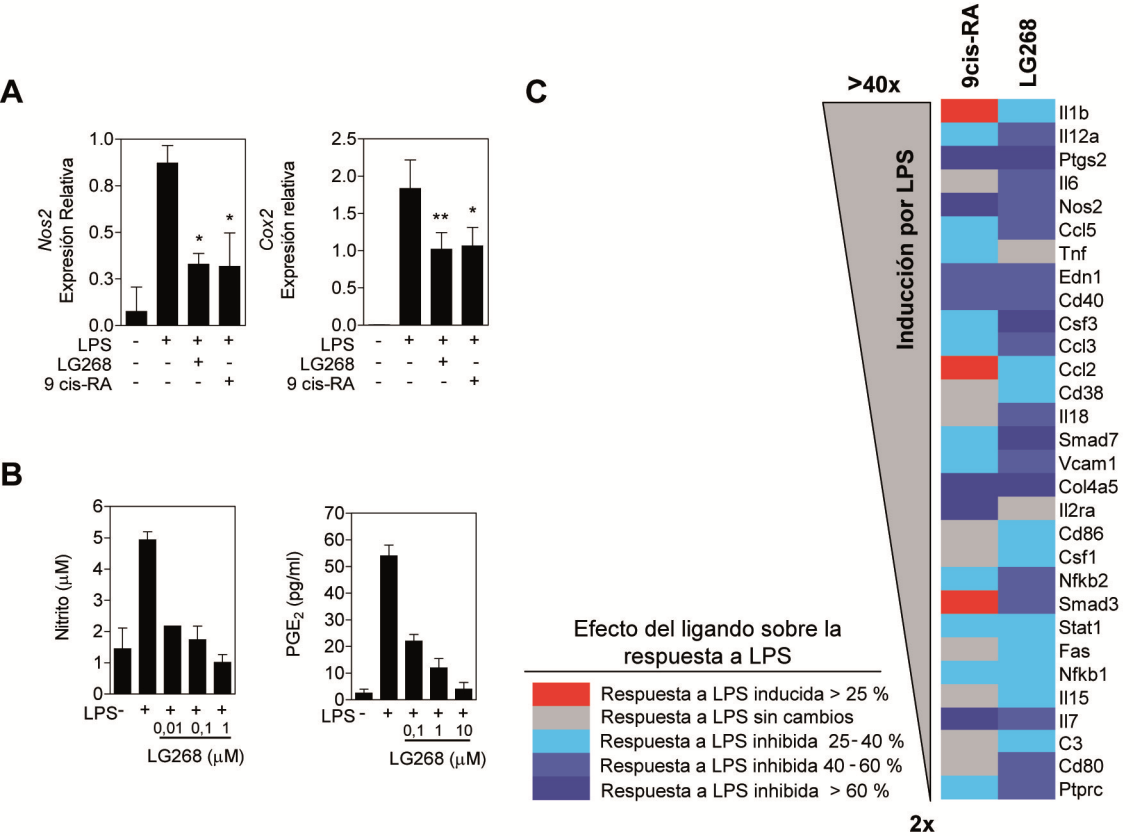


Fig 11. La activación de RXR inhibe la expresión de genes inducidos por LPS. A. Expresión de *Nos2* y *Cox2* en macrófagos peritoneales tratados con LPS (100 ng/mL) en ausencia o presencia de los ligandos de RXR LG268 o 9cis-RA (ambos a 1 μM). **B.** Acumulación de los productos enzimáticos de NOS2 y COX2 (nitritos y prostaglandina E2 respectivamente) en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales en presencia de LPS y dosis crecientes de LG268 (0,01 μM, 0,1 μM y 1 μM). **C.** Porcentaje de represión de genes inducidos por LPS en presencia de 9cis-RA o LG268. El porcentaje se midió en base a los niveles de expresión de cada gen en el panel en macrófagos peritoneales tratados con LPS (100 ng/mL) en ausencia o presencia de ligando mediante qPCR. 18 h de tratamiento con ligando seguido de 6 h de tratamiento con LPS. *p≤0,05; **p≤0,01; prueba *t-Student* pareada.

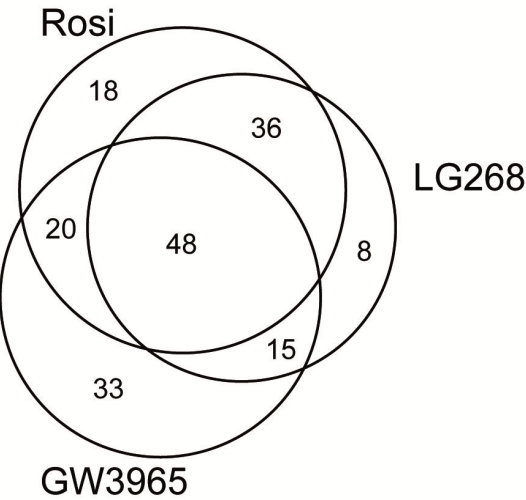
4.2.2. El tratamiento con LG268 reprime genes diana de PPAR γ y LXR

RXR puede formar homodímeros y heterodímeros permisivos de RXR con ciertos receptores en respuesta a LG268. Estos heterodímeros se activan por cualquiera de los ligandos de los receptores que lo forman. PPAR γ y LXR son los receptores que mayoritariamente establecen heterodímeros permisivos con RXR en macrófagos. La formación de este tipo de heterodímeros se ha estudiado ampliamente en el contexto de transactivación en respuesta a ligando. Se desconoce si los mecanismos de transrepresión de PPAR γ o LXR están mediados por la formación de heterodímeros con RXR. La inhibición de la transcripción dependiente de RXR tampoco ha sido explorada en profundidad. Para explorar el posible papel de PPAR γ o LXR en el mecanismo de represión transcripcional de RXR, se compararon los perfiles de expresión de los genes diana de NF κ B reprimidos por RXR, PPAR γ y LXR.

Para ello, se utilizó la tecnología del microarray para medir los cambios de la expresión génica en macrófagos peritoneales estimulados con LPS en presencia o ausencia de LG268, Rosi o GW3965 (ligandos de RXR, PPAR γ y LXR respectivamente). Entre todos los genes expresados, se seleccionaron aquellos inducidos por el tratamiento con LPS (más de 2 veces) y reprimidos más de un 50% en presencia del ligando. Los grupos de genes reprimidos específicamente por cada RN se compararon entre sí y se representaron en un diagrama de Venn (Figura 12A). El número total de genes reprimidos por el tratamiento con LG268 fue similar al regulado por Rosi o GW3965. PPAR γ y LXR comparten cierto número de genes diana como se ha descrito en otros trabajos publicados²⁰⁴. En el caso de RXR, la mayoría de genes regulados por LG268 son genes diana de PPAR γ o LXR. Sólo 8 de un total de 107 genes reprimidos por LG268 no responden al tratamiento con Rosi o GW3965. También se encontraron genes insensibles al tratamiento con LG268, que redujeron su expresión en presencia de Rosi o GW3965.

Se realizó un análisis de los genes reprimidos para identificar elementos reguladores en la secuencia de sus promotores proximales (Figura 12B). En los grupos de genes analizados se identificaron motivos específicos de NF κ B y otros factores relacionados con la respuesta a LPS. Sin embargo, no se encontraron HRE específicos de RXR, PPAR γ o LXR que pudieran sugerir una unión directa de estos receptores al promotor de estos genes. Por tanto, este resultado sugiere que el mecanismo de represión de RXR es independiente de la unión al ADN, como en el caso de los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR.

A



B

Genes reprimidos por LG268		
Motivo	Nombre	p-valor
	EWS:ERG (ETS)	1e-3
	NFkB-p65(RHD)	1e-2
	p53(p53)	1e-2
	NFkB-p65-Rel(RHD)	1e-2

Genes reprimidos por ROSI		
Motivo	Nombre	p-valor
	EWS:ERG (ETS)	1e-3
	NFkB-p65(RHD)	1e-2
	Tcfcp211 (CP2)	1e-2
	NFkB-p65-Rel(RHD)	1e-2

Genes reprimidos por GW3965		
Motivo	Nombre	p-valor
	ISRE(IRF)	1e-3
	Atf1(bZIP)	1e-2
	EWS:ERG-fusion(ETS)	1e-2
	NFkB-p65-Rel(RHD)	1e-2

C

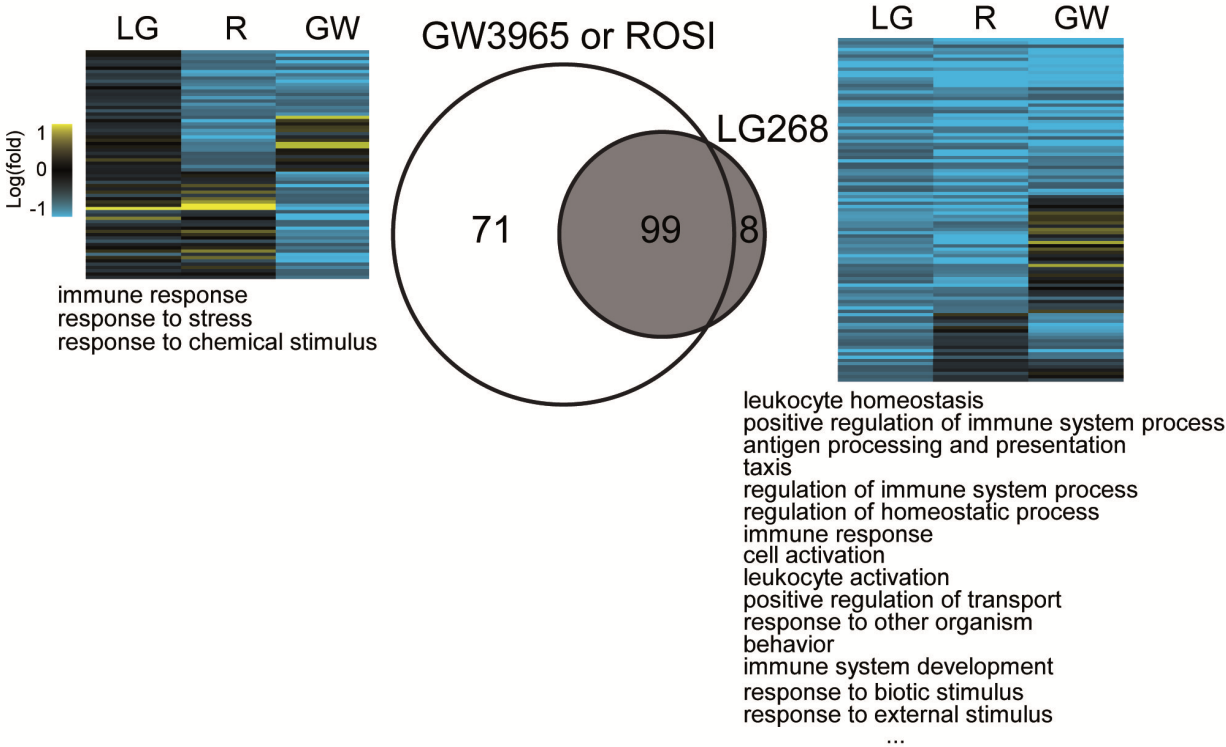


Fig 12. El tratamiento con LG268 reprime genes diana de PPAR γ y LXR implicados en funciones biológicas comunes. **A.** Diagrama de Venn en el que se representa el número de genes reprimidos por los ligandos específicos de RXR, PPAR γ o LXR (LG268, Rosi y GW3965 respectivamente) en macrófagos identificados mediante análisis de expresión diferencial de un perfil genético de ratón. Se incubaron macrófago peritoneales en presencia o ausencia de ligandos (1 μ M) durante 18 h y posteriormente se trataron con LPS (100 ng/mL) durante 6 h. Se seleccionaron los genes reprimidos más de un 50% con un FDR \leq 0,2. **B.** Análisis de enriquecimiento en secuencias consenso de factores de transcripción en el promotor proximal (-500pb, +100pb) de genes reprimidos por LG268, Rosi o GW3965 identificados en A. **C.** Análisis de ontología de genes regulados en presencia de GW3965 o Rosi pero resistentes al tratamiento con LG268 y aquellos genes regulados por LG268.

Para explorar las características funcionales de los genes regulados por LG268, se separaron dos grupos de genes según fueran sensibles o no al ligando de RXR. Se analizaron ambos grupos en busca de enriquecimiento en términos de funciones biológicas descritas en la base de datos *Gene Ontology* (Figura 12C). Se encontró un número elevado de funciones biológicas asociadas significativamente a aquellos genes regulados por LG268, como “activación celular”, “respuesta a estímulo externo” o “taxis”. En cambio, aquellos genes reprimidos por PPAR γ o LXR pero resistentes a LG268 sólo presentaron enriquecimiento en funciones generales como “respuesta inmune”, “respuesta a estrés” o “respuesta a estímulo químico”. Estas son funciones características de todos aquellos genes inducidos por LPS y por tanto, no están vinculadas a la sensibilidad de estos genes al tratamiento con Rosi o GW3965. Los genes reprimidos por Rosi o GW3965 que también se regulan por LG268 tienen un mayor enriquecimiento en funciones biológicas que aquellos cuya regulación es independiente de LG268. Ello sugiere que las funciones biológicas más relevantes reprimidas por PPAR γ o LXR durante la activación del macrófago por LPS, son también sensibles al tratamiento con LG268.

En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo de transrepresión de RXR pero no permiten descartar la participación de PPAR γ o LXR en el mecanismo. De hecho, el amplio solapamiento entre los genes diana RXR y los de PPAR γ o LXR también sugiere la existencia de un mecanismo en el que participen los tres receptores.

4.2.3. RXR inhibe la transcripción de genes pro-inflamatorios en ausencia de PPAR γ y LXR

En el caso de la regulación de las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9* se observó que los homodímeros de RXR α tenían un papel esencial en el control de su expresión. Del mismo modo, RXR podría actuar como homodímero para reprimir la expresión de genes dependientes de LPS. Para explorar las características del mecanismo de represión de RXR, se realizaron ensayos de luciferasa en la línea celular murina *Raw 264.7*. Este sistema permite analizar la actividad de RXR en ausencia de PPAR γ o LXR *in vitro*. Para ello, es necesario que no exista actividad endógena de RXR, PPAR γ y LXR en la línea celular utilizada. Para comprobarlo, se midió la respuesta a ligando de promotores con HRE específicos de cada RN en ensayos de luciferasa. Para detectar la presencia de PPAR γ y RXR, se transfectaron las células *Raw 264.7* con un plásmido reportero con el gen de la luciferasa controlado por el promotor sintético AOX3. Este promotor contiene tres elementos DR-1 (AOX3-luc), que son reconocidos

por ambos receptores (Figura 13A). El tratamiento con LG268 o 9cis-RA no produjo ningún efecto en AOX3-luc. Sin embargo, cuando se sobreexpresó RXR α empleando un plásmido de expresión, se obtuvo un incremento significativo de la señal de luciferasa en respuesta a estos ligandos. El tratamiento con Rosi no produjo ningún cambio en presencia o ausencia de RXR α , lo que sugiere que los efectos observados en presencia de los ligandos de RXR son independientes de PPAR γ . También se co-transfectaron los plásmidos de expresión de PPAR γ y RXR α para confirmar que el tratamiento con Rosi induce el promotor cuando ambos receptores están presentes. Para detectar la actividad de LXR se empleó el plásmido reportero de luciferasa LXRE3x-luc que contiene tres elementos DR-4 específicos de LXR (Figura 13B). El tratamiento con el ligando de LXR GW3965 indujo la transcripción de luciferasa sólo cuando se sobreexpresaron RXR α y LXR α . De este modo, se comprobó que en este tipo de ensayo en células *Raw 264.7* la respuesta a ligandos de RXR también es independiente de LXR.

Para estudiar el mecanismo de represión de RXR se utilizaron tres plásmidos reporteros de luciferasa controlados por promotores inducibles por LPS. Dos de ellos con promotores naturales de los genes pro-inflamatorios *Nos2* y *Cox2* (Nos2-luc y Cox2-luc respectivamente) y el tercero con un promotor sintético formado por tres sitios de unión del factor de transcripción NF κ B (NF κ B3x-luc). Las células se estimularon con LPS en presencia o ausencia de los ligandos LG268, Rosi o GW3965 (Figura 13C). La estimulación con LPS produjo un aumento significativo de la transcripción de luciferasa de estos plásmidos reporteros. En ausencia de RXR α los ligandos no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de expresión de luciferasa inducidos por LPS. Sin embargo, el tratamiento con LG268 reprimió significativamente los niveles de luciferasa de los tres promotores cuando se sobreexpresó RXR α . Los demás ligandos no regularon la actividad de los promotores. Estos resultados sugieren que RXR α es capaz de reprimir la inducción de genes pro-inflamatorios en respuesta a su ligando específico con independencia de PPAR γ y LXR *in vitro*.

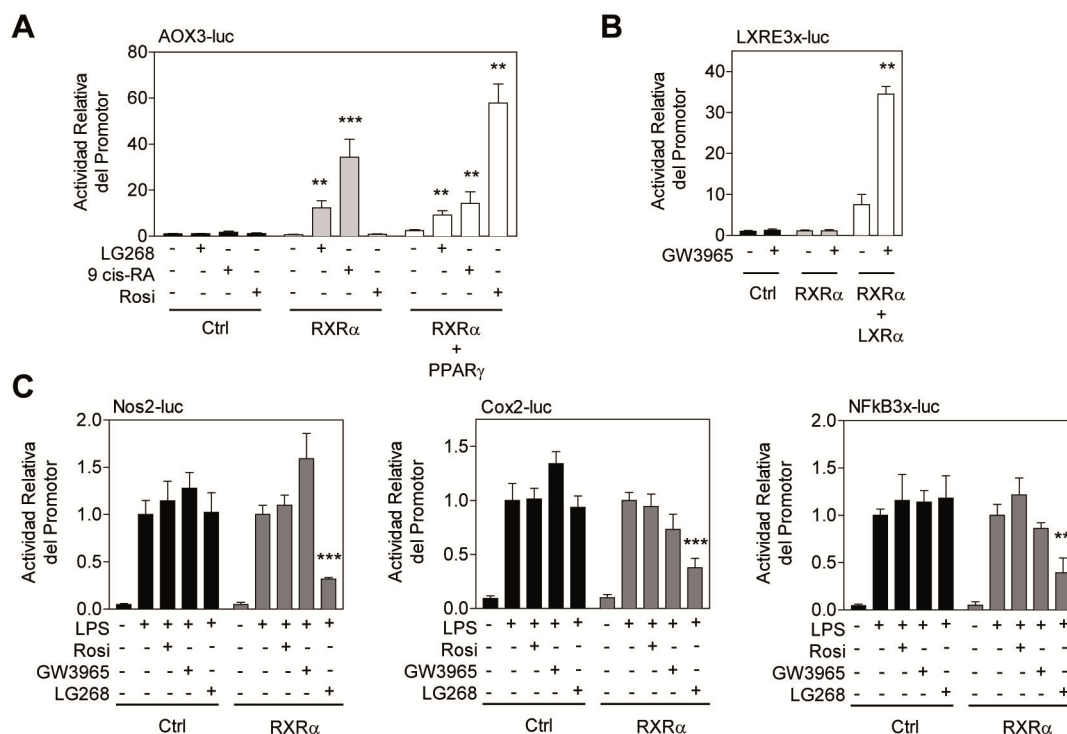


Fig 13. RXR α reprime la transcripción por un mecanismo independiente de PPAR γ o LXR. **A.** Respuesta del promotor sintético AOX3 al estímulo con ligandos de RXR (LG268 y 9cis-RA, 1 μ M) y PPAR γ (Rosi, 1 μ M) en células *Raw 264.7* tratadas durante 24 h. Las células se cotransfectaron con el plásmido reportero que contiene el promotor y los plásmidos de expresión pCMX-hRXR α , pCMX-mPPAR γ o el plásmido vacío pCMX (Ctrl) como se indica. La actividad del promotor se midió como cambios en la actividad luciferasa. **B.** Actividad del promotor LXRE3x en respuesta al ligando de LXR (GW3965, 1 μ M) en células *Raw 264.7* tratadas durante 24 h. Las células se cotransfectaron con el plásmido reportero que contiene el promotor y los plásmidos de expresión pCMX-hRXR α , pCMX-hLXR α o el plásmido vacío pCMX (Ctrl) como se indica. La actividad del promotor se midió como cambios en la actividad luciferasa. Valores normalizados con el valor en la condición Ctrl en ausencia de ligando. **C.** Efecto de los ligandos LG268 (1 μ M), Rosi (1 μ M) y GW3965 (1 μ M) sobre la activación de los promotores de *Nos2* y *Cox2* y el promotor sintético NFkB3x en respuesta a LPS (1 μ g/mL). Se cotransfectaron células *Raw 264.7* con el plásmido reportero que contiene el promotor correspondiente y los plásmidos de expresión pCMX-hRXR α o el vector vacío pCMX (Ctrl). Las células se trataron durante 18h con LPS o en combinación con ligando. Datos normalizados con el valor de la condición Ctrl en células tratadas con LPS. Los valores son medias \pm SD de triplicados de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ prueba *t-Student* pareada.

4.2.4. Los homodímeros de RXR α transreprimen la actividad de NF κ B

Se continuó el análisis de las características de RXR α como represor de la transcripción empleando versiones mutadas de este receptor en ensayos de luciferasa. Para ello, se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en los experimentos anteriores en células *Raw 264.7*.

En el análisis de búsqueda de motivos realizado en los promotores de los genes reprimidos por LG268 no se encontraron elementos DR-1, lo que sugería que RXR no se une al ADN para reprimir la transcripción. Para determinar el modo en el que RXR reprime los genes inducibles por LPS se empleó una versión de RXR α con una mutación puntual que impide su unión al ADN, sin alterar los dominios de unión al ligando o de dimerización (RXR α -DBDmut)²⁰⁵. Para comprobar la pérdida de función del mutante se empleó el plásmido AOX3-luc al que RXR debe unirse reconociendo los sitios DR-1 para transcribir. Como se muestra en la Figura 14A, la mutación impide la inducción de la actividad luciferasa en respuesta a los ligandos de RXR confirmando la pérdida de función del mutante en transactivación. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la actividad del mutante y la versión *wild type* en la represión de la inducción dependiente de LPS en presencia de LG268 de los plásmidos reporteros *Nos2-luc*, *Cox2-luc* o *NF κ B3x-luc* (Figura 14B). El resultado

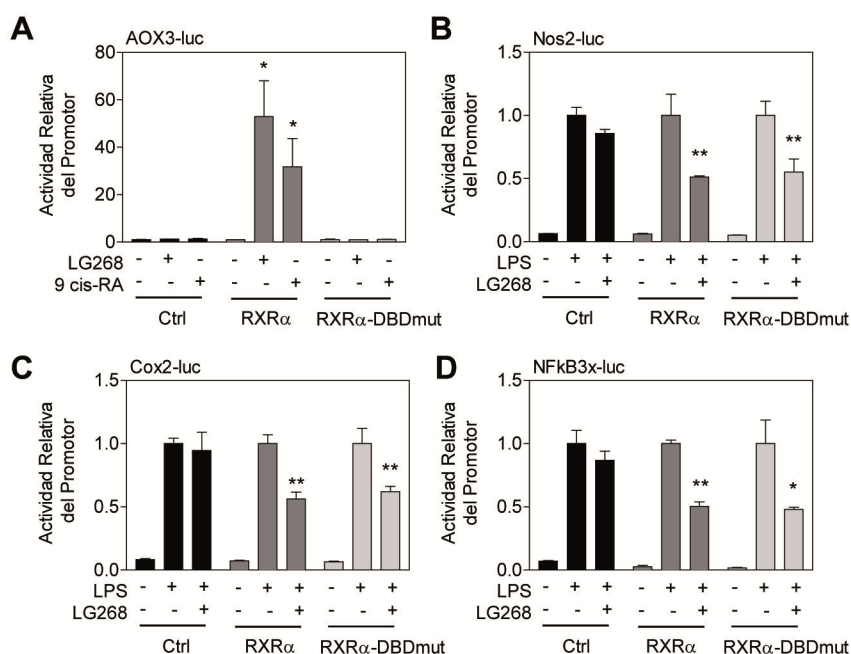


Fig 14. RXR α no se une al ADN para reprimir la expresión de genes dependientes de LPS. Actividad transcripcional del promotor sintético AOX3 (A), los promotores de los genes *Nos2* (B) y *Cox2* (C), y el promotor sintético NF κ B3x (D) medida como actividad de luciferasa en células *Raw 264.7* transfectadas con plásmidos reporteros que contienen dichos promotores y los plásmidos de expresión pCMX-hRXR α (RXR α), pCMX-hRXR α -DBDmut (RXR α -DBDmut) o el plásmido vacío pCMX (Ctrl), en ausencia o presencia de ligandos de RXR (1 μ M) o LPS (1 μ g/mL) según se indica. Los valores son medias \pm SD de triplicados de al menos 3 experimentos independientes. Datos normalizados con el valor en la condición Ctrl en ausencia de ligando (A) o el valor en presencia de LPS (B-D). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; prueba *t-Student* pareada.

sugiere que RXR α no se une al ADN de los promotores pro-inflamatorios y, por tanto, inhibe la transcripción mediante el mecanismo conocido como transrepresión.

Los ligandos de RN pueden tener asociados efectos independientes de la unión a su receptor específico. Para confirmar que la represión dependiente de LG268 se debe a la acción a través RXR α se utilizó un mutante con una delección en el dominio de unión a ligando AF2 (RXR α Δ AF-2). Se comprobó el efecto de la mutación en las funciones de RXR α en transactivación utilizando la construcción AOX3-luc (Figura 15A). Cuando se sobreexpresó RXR α *wild type* se produjo un aumento en los niveles de luciferasa en respuesta a LG268 o 9cis-RA, mientras que no se produjeron cambios en presencia de RXR α Δ AF-2. Del mismo modo, la inducción de los promotores pro-inflamatorios no fue inhibida por el mutante en presencia de LG268 (Figura 15B-D).

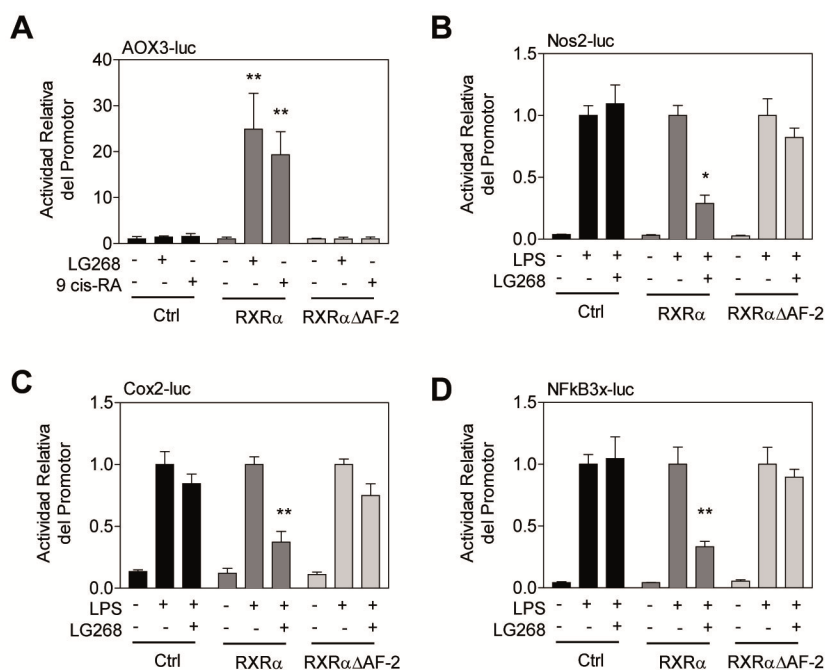


Fig 15. La transrepresión genes pro-inflamatorios por RXR α es dependiente de ligando. Actividad transcripcional del promotor sintético AOX3 (A), los promotores de los genes *Nos2* (B) y *Cox2* (C), y el promotor sintético NFkB3x (D) medida como actividad de luciferasa en células *Raw 264.7* transfectadas con plásmidos reporteros que contienen dichos promotores y los plásmidos de expresión pCMX-hRXR α (RXR α), pCMX-hRXR α Δ AF-2 (RXR α Δ AF-2) o el plásmido vacío pCMX (Ctrl), en ausencia o presencia de ligandos de RXR (1 μ M) o LPS (1 μ g/mL) según se indica. Datos normalizados con el valor en la condición Ctrl en ausencia de ligando (A) o el valor en presencia de LPS (B-D). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ prueba *t-Student* pareada.

Por último, para identificar si RXR α transreprime como homodímero se utilizó un mutante de RXR α (RXR α Y402A), cuya interacción con otros RN es muy ineficiente, mientras que la formación de homodímeros se produce de manera estable⁶⁴. También se utilizó otro mutante (RXR α -AEE) con una sustitución de aminoácidos en la superficie de dimerización en el LBD que impide que se formen homodímeros o heterodímeros con otros receptores⁷⁵. Mediante la técnica de *Western blot* se comprobó que ambos mutantes se expresan correctamente (Figura 16A). Cuando se sobreexpresó RXR α en células *Raw 264.7* se produjo la activación de la transcripción del promotor AOX3 por RXR α en respuesta a su ligando (Figura 16B). Además, este RXR α exógeno también respondió a LG268 transreprimiendo la inducción de los promotores inducibles por LPS, lo que se observa como una reducción en la actividad relativa de luciferasa (Figura 16C-E). Esta respuesta al ligando en transactivación y

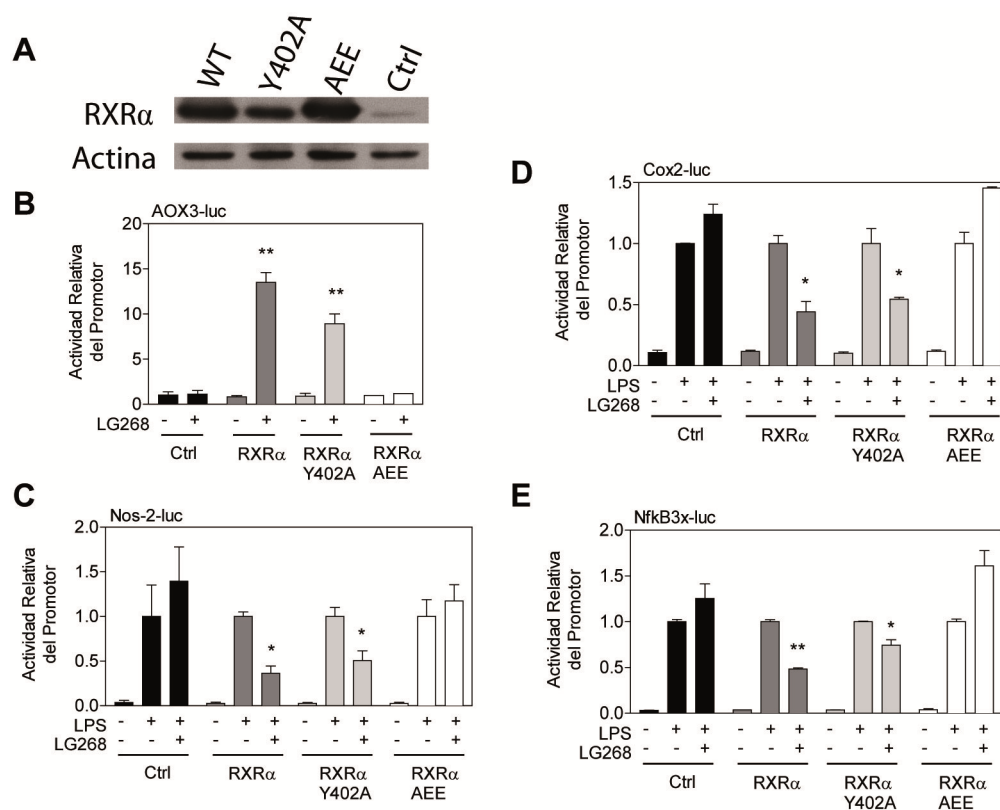


Fig 16. Los homodímeros de RXR α regulan la transactivación y transrepresión en respuesta a LG268. **A.** Proteína traducida del plásmido pCMX-hRXR α y sus versiones mutadas pCMX-RXR α -Y402A y pCMX-RXR α -AEE en células Hek 293t detectadas mediante *western blot*. **B-E.** Actividad transcripcional relativa del promotor sintético AOX3 (B), los promotores de *Nos2* (C) y *Cox2* (D), y el promotor sintético NfκB3x (E) medida como cambios en la actividad luciferasa en células *Raw 264.7*. Se cotransfectaron los plásmidos reporteros con el promotor correspondiente junto con combinaciones de pCMX (Ctrl), pCMX-hRXR α , pCMX-RXR α -Y402A o pCMX-RXR α -AEE según se indica. Las células se incubaron en presencia o ausencia de los ligandos LG268 (100 nM) durante 18 h o en combinación con LPS (100 ng/mL). Datos normalizados con el valor en la condición Ctrl en ausencia de ligando en B, y con el valor en el tratamiento con LPS en C-E. Los valores son medias \pm SD de triplicados de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; prueba *t-Student* pareada.

transrepresión se produjo de manera similar cuando, en lugar de la versión *wild type* de RXR α , se sobreexpresó la versión mutada RXR α Y402A (Figura 16B-E), lo que sugiere que el homodímero de RXR es el responsable de los cambios en la respuesta de luciferasa dependientes de ligando en estos promotores. La formación de dímeros es esencial para transactivación, por ello no se observó respuesta alguna al ligando cuando se empleó el mutante RXR α -AEE para inducir el promotor AOX3 (Figura 16B). Cuando se co-transfectó este mutante con los plásmidos reporteros Nos2-luc, Cox2-luc o NF κ B3x-luc, a diferencia de la versión *wild type*, no se observó inhibición de la transcripción de estos promotores en presencia de ligando (Figura 16C-E). Este resultado sugiere que la formación de homodímeros de RXR es un requisito necesario para que se produzca la represión de la transcripción dependiente de LPS en respuesta a LG268.

4.2.5. La transrepresión mediada por RXR α es independiente de coactivadores

RXR comparte varios coactivadores con NF κ B, entre ellos CBP y SRC-1²⁰⁶. Estos se unen a RXR cuando se activa con su ligando y por tanto, podría reducir la accesibilidad de NF κ B a los coactivadores, dificultando así la inducción de la transcripción dependientes de LPS.

Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de luciferasa en los que se emplearon dos mutantes de RXR α con sustituciones de aminoácidos en el dominio de unión a coactivadores, que impiden la interacción con estos (RXR α E453K y RXR α E456K)²⁰⁷. La transactivación depende de que se produzca el reclutamiento de coactivadores que se unen a RXR cuando este es activado por su ligando. Por ello, se utilizó la construcción AOX3-luc para comprobar la funcionalidad de las versiones mutadas frente a la *wild type*. La respuesta a ligandos de RXR se redujo significativamente cuando se sobreexpresaron RXR α E453K o RXR α E456K, comparado con la inducción mediada por la versión *wild type* (Figura 17A). Sin embargo, la represión de la respuesta a LPS de los promotores pro-inflamatorios en presencia de LG268 no sufrió cambios significativos cuando se sobreexpresaron las versiones mutadas de RXR α en lugar del *wild type* (Figura 17B). Por otro lado, se comprobó el papel de los coactivadores incrementando su disponibilidad en la célula introduciendo CBP o SRC-1 exógeno mediante un plásmidos de expresión. El aumento de la expresión de CBP o SRC-1 produjo un incremento en la actividad de AOX3-luc en respuesta a ligandos de RXR, ya que la mayor disponibilidad de coactivadores permite mayor eficiencia de transcripción del promotor (Figura 17C). También se observó un incremento en la respuesta a LPS de los promotores Nos2-luc,

Cox2-luc o NFkB3x-luc. En cambio, la inhibición de la actividad de estos promotores en presencia de LG268 fue similar a la condición control (Figura 17D). Estos resultados sugieren que RXR transreprime la transcripción con independencia de la unión de coactivadores.

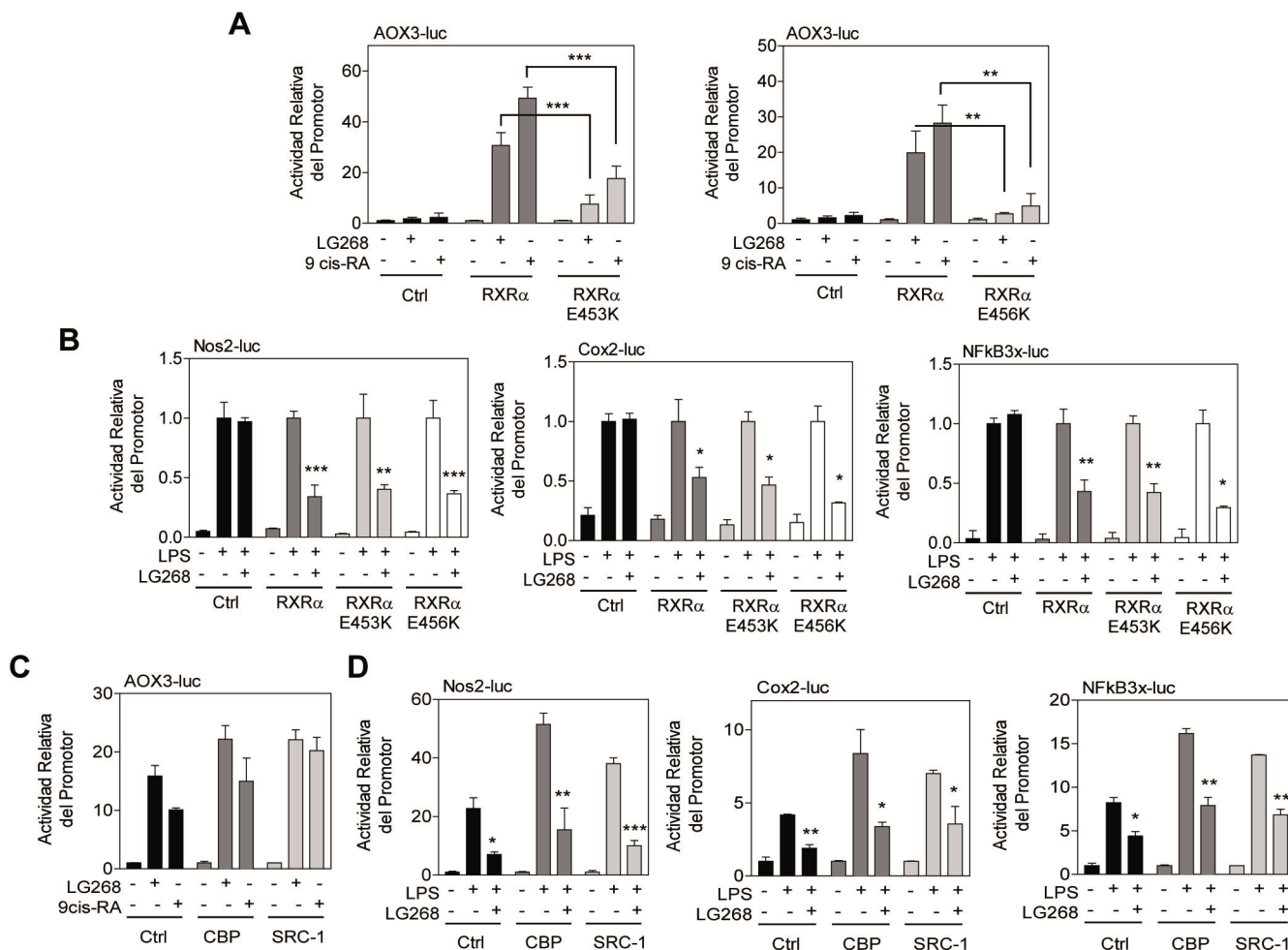


Fig 17. No se produce competición por los coactivadores entre NFkB y RXRα. **A.** Efecto de las mutaciones de RXRα E453K (izquierda) y E456K (derecha) sobre la actividad transcripcional del promotor AOX3 medida como señal luciferasa en respuesta a ligandos de RXR. Se cotransfectaron células Raw 264.7 con el plásmido reportero que contiene el promotor junto con los plásmidos indicados y se incubaron con LG268 (100 nM) o 9cis-RA (100 nM) durante 24 h. Datos normalizados con el valor en la condición Ctrl en ausencia de ligando. **B.** Actividad transcripcional de los promotores de Nos2 y Cox2 y el promotor sintético NFkB3x medida como actividad luciferasa en células Raw 264.7 tratadas con LPS (1 µg/mL) o en combinación con LG268 (100 nM) durante 18 h. Las células se cotransfectaron con el plásmido reportero correspondiente y los plásmidos indicados. Datos normalizados con el valor en el tratamiento con LPS en cada condición. **C-D.** Actividad transcripcional del promotor AOX3 (C) y los promotores de Nos2 y Cox2 y el promotor sintético NFkB3x (D) medida como actividad luciferasa en células Raw 264.7 tratadas con el ligando LG268 (10 nM) durante 24 h (C) o con LPS (10 ng/mL) y LG268 (10 nM) en combinación durante 18 h. Las células se cotransfectaron con el plásmido reportero que incluye el promotor correspondiente y pCMX-hRXRα junto con el plásmido indicado. Datos normalizados con el valor en ausencia de ligando en C y con el valor en el tratamiento con LPS en D. Los valores son medias ± SD de triplicados de al menos 3 experimentos independientes. pSG5 (Ctrl), pCMX-hRXRα (RXRα), pCMV-CBP (CBP), pcDNA3-SRC-1 (SRC-1). *p≤0,05; **p≤0,01; prueba t-Student pareada.

4.2.6. RXR transreprime por un mecanismo dependiente de PPAR γ en macrófagos peritoneales

Una vez descritas las principales características del mecanismo de transrepresión de los homodímeros de RXR *in vitro*, se decidió explorar la existencia de este mecanismo en macrófagos primarios que expresan RXR, PPAR γ y LXR. El ligando LG268 empleado en los estudios *in vitro* activa tanto a homodímeros de RXR como a los heterodímeros que forma con PPAR γ o LXR. Por ello, se utilizaron macrófagos WT, RXR $\alpha\beta$ DKO, PPAR γ KO y LXR $\alpha\beta$ DKO para evaluar el papel de homodímeros y heterodímeros de RXR en transrepresión. En este estudio se empleó el lípido A Kdo-2 (KLA) para estimular la vía TLR4 en el macrófago, este ligando es una forma purificada del fragmento inmunogénico del LPS. Se utilizó la tecnología de secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq, en sus siglas en inglés) para medir la expresión de genes inducibles por KLA en presencia o ausencia de LG268, Rosi o GW3965 en macrófagos WT o KO. Del análisis de expresión en células WT se seleccionaron aquellos genes inducidos más de dos veces por KLA y reprimidos significativamente por cada ligando. Los resultados se representaron en un diagrama de Venn (Figura 18A). Se comprobó que la distribución de genes regulados por cada receptor era similar a la distribución observada en el estudio anterior realizado con la tecnología de microarray estimulando con LPS (Figura 12A).

Para el análisis de las funciones de RXR se estudiaron los genes reprimidos por LG268. Estos genes se clasificaron en grupos con patrones de expresión similares en macrófagos WT y RXR $\alpha\beta$ DKO, PPAR γ KO y LXR $\alpha\beta$ DKO mediante un análisis de *k-means clustering* (Figura 18B). Este análisis clasificó los genes en 4 grupos o *clusters*. Todos ellos muestran la represión por LG268 en células WT y la pérdida de esta represión en células RXR $\alpha\beta$ DKO excepto en los genes del *cluster* 3, para los que la pérdida del efecto en el KO fue parcial. Sorprendentemente, la mayoría de genes estudiados perdieron total o parcialmente la represión por LG268 en macrófagos PPAR γ KO (167 de 227, *clusters* 1 y 2). En cambio, la ausencia de LXR en macrófagos LXR $\alpha\beta$ DKO en general no provocó ningún efecto en la represión dependiente de LG268 (*Clusters* 1 y 2), excepto en el *cluster* 4 en el que se encuentra un pequeño número de genes (26) que se reprimen sólo parcialmente por LG268 en macrófagos LXR $\alpha\beta$ DKO. No se observaron genes que estuvieran reprimidos por LG268 en ausencia de PPAR γ que también lo estuvieran en ausencia de LXR, los cuales serían genes posiblemente regulados por homodímeros de RXR. Estos resultados sugieren que, en macrófagos primarios, el heterodímero de PPAR γ tiene un papel importante en

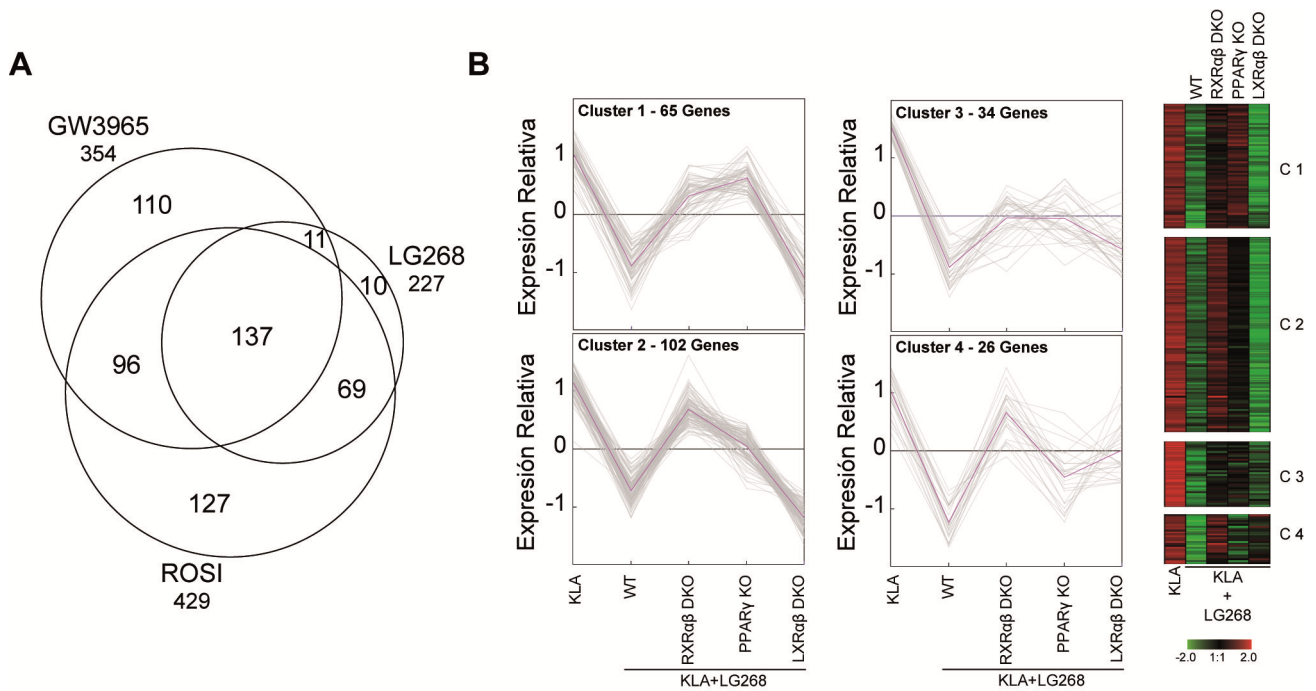


Fig 18. LG268 reprime la transcripción de genes pro-inflamatorios por un mecanismo dependiente de RXR y PPAR γ en macrófagos primarios. **A.** Diagrama de Venn que representa el número de genes inducidos por KLA y reprimidos significativamente por los ligandos específicos de RXR, PPAR γ o LXR (LG268, Rosi y GW3965 respectivamente) en macrófagos peritoneales. Las células se preincubaron con los ligandos (1 μ M) durante 18 h seguido de tratamiento con KLA (5 ng/mL) durante 6h. Se analizaron aquellos genes inducidos ≥ 2 veces por KLA y reprimidos significativamente por cada ligando respecto a células tratadas solo con KLA (p ajustada $\leq 0,05$). **B.** Patrón de expresión de los genes reprimidos por LG268 en A en macrófagos peritoneales WT, RXR $\alpha\beta$ DKO, PPAR γ KO y LXR $\alpha\beta$ DKO. Se realizó un agrupamiento por *k-means* para separar los genes en clusters (C1-4) por similitud en el patrón de expresión. Los *heatmap* representan el Z-score de los genes en cada condición experimental señalada, rojo: incremento de expresión, verde: descenso de expresión.

el mecanismo de transrepresión de RXR, mientras que LXR o los homodímeros de RXR no parecen ser esenciales en la represión mediada por LG268 *in vivo*.

Para profundizar en la relación entre RXR y PPAR γ en transrepresión dependiente de LG268, se analizó la unión de estos receptores y de NF κ B a sitios reguladores de la transcripción en el genoma. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina de RXR, PPAR γ y la subunidad p65 de NF κ B acoplados con secuenciación masiva (ChIP-Seq, en sus siglas en inglés) en macrófagos peritoneales. En la literatura se ha descrito la interacción de los RN con NF κ B como una característica esencial del mecanismo de transrepresión^{53,54}. Por este motivo, se estudió la co-localización de RXR con NF κ B en loci cercanos a los genes reprimidos por LG268. Para describir el mapa genómico de unión de NF κ B se identificaron los sitios de unión (picos) de su subunidad p65. De los picos p65 encontrados se filtraron aquellos presentes en posiciones corriente arriba o corriente

abajo ($\pm 100\text{kb}$) del sitio de inicio de la transcripción (TSS, en sus siglas en inglés) de aquellos genes reprimidos por LG268 (Figura 19A). Estos picos situados en la proximidad de los genes potencialmente regulan su transcripción²⁰⁸. Posteriormente, se compararon estos picos p65 con picos de RXR encontrados en experimentos de ChIP-Seq en macrófagos en presencia o ausencia de LG268. Se comprobó que el número de loci donde RXR co-localiza con p65 (loci picos p65-RXR), encontrados en ambas condiciones experimentales, se solapan casi por completo (Figura 19B). Este resultado sugiere que el tratamiento con ligando no provoca un cambio relevante de posición de RXR entre los sitios ocupados por p65. Para comprobar si el tratamiento con ligando tenía algún efecto sobre la intensidad de unión de RXR en los loci p65-RXR encontrados, se cuantificó la unión de RXR en los sitios p65-RXR comunes a ambas condiciones experimentales (Figura 19C). La intensidad de unión medida como lecturas de secuenciación (tags) por pico permaneció similar en ambas condiciones experimentales, lo que indica que el ligando tampoco favorece un incremento en la unión de RXR. Para el posterior estudio se seleccionaron estos loci p65-RXR comunes a ambos tratamientos por su robustez y reproducibilidad entre experimentos. La ausencia de efecto del ligando en loci p65-RXR permitió continuar el estudio de la unión de RXR y PPAR γ en macrófagos en ausencia de ligando. No todos los sitios p65 analizados se encontraron ocupados por RXR, por ello se cuantificó el porcentaje de genes regulados por LG268 con al menos un locus p65-RXR en su proximidad (Figura 19D). Un 80% de los genes regulados por RXR se encontraron asociados a algún locus p65-RXR. Esto sugiere que la unión de RXR en sitios p65 es relevante para la regulación de la mayoría de genes reprimidos por LG268. Se ha demostrado que una parte importante del efecto represor de LG268 se pierde en macrófagos PPAR γ KO (Figura 18B), por ello se analizó la presencia de PPAR γ mediante ChIP-Seq en los loci p65-RXR descritos. En estos loci se observó una amplia presencia de PPAR γ visualizada mediante *heatmap*. Cuando se cuantificó la unión de PPAR γ se observó que más del 50% de los loci p65-RXR están asociados con picos PPAR γ (loci p65-RXR-PPAR γ), lo que indica una estrecha relación entre RXR y PPAR γ en estos sitios p65 (Figura 19E y F). Además, se observó una pérdida importante de sitios PPAR γ en células RXR $\alpha\beta$ DKO, sólo se encontraron 65 loci p65-RXR-PPAR γ ocupados por PPAR γ en ausencia de RXR de un total de 306 presentes en célula WT. La ausencia de RXR provocó también una reducción de la intensidad de unión de estos loci que se observó midiendo el número de tags por pico en células WT y RXR $\alpha\beta$ DKO en presencia o ausencia de Rosi o LG268 (Figura 19G). Esto sugiere que la unión de PPAR γ a estos sitios reguladores es dependiente de RXR. En conjunto, estos

resultados junto con los obtenidos en el análisis de expresión diferencial de la represión génica en respuesta a ligando, indican que RXR heterodimeriza con PPAR γ para permitir su unión a p65 en loci relevantes para un mecanismo de transrepresión común a ambos receptores, que puede activarse por cualquiera de sus ligandos.

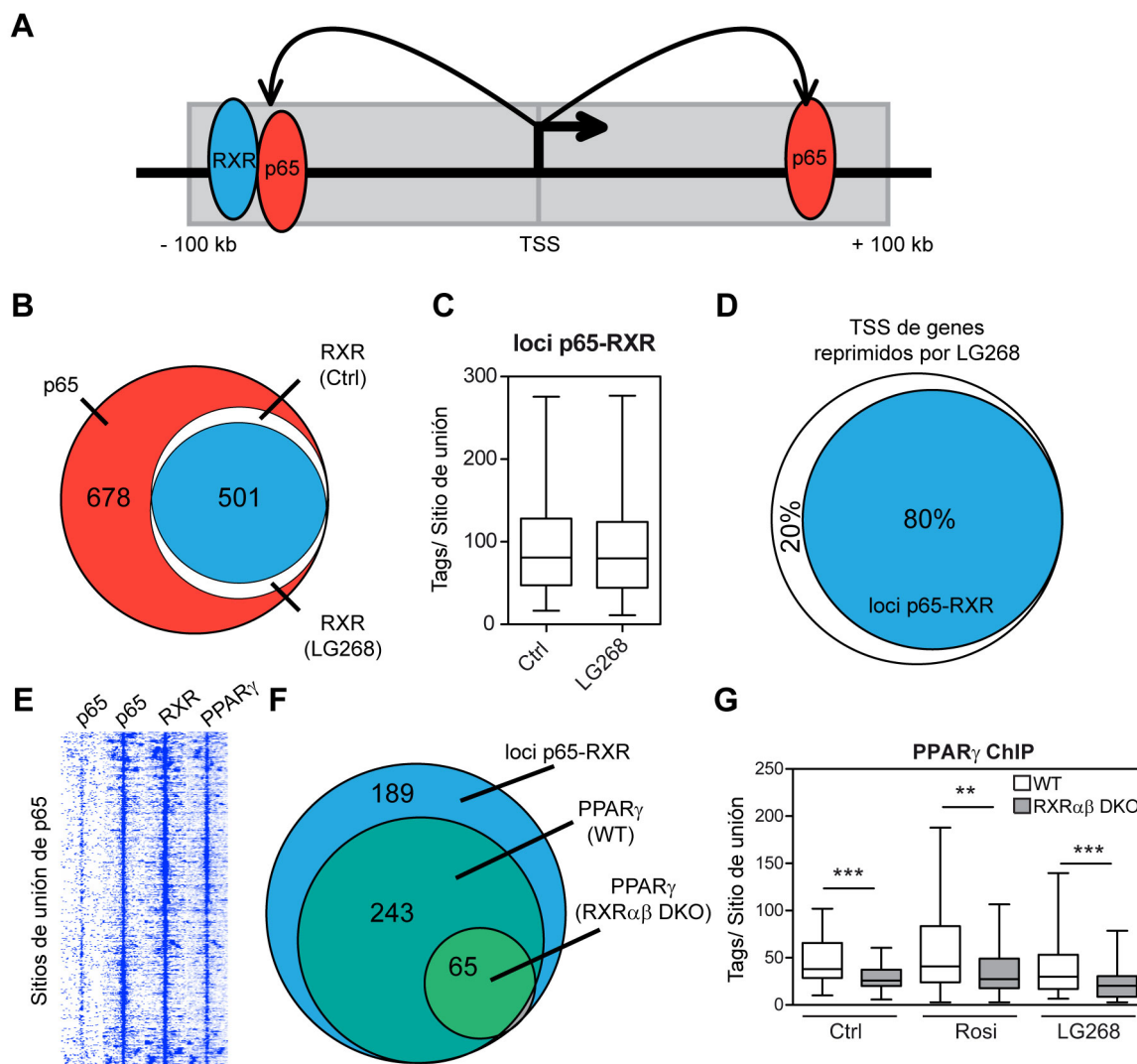


Fig 19. Unión de RXR y PPAR γ con p65 alrededor de genes reprimidos por LG268. **A.** Esquema de la búsqueda de sitios de unión (picos) de factores de transcripción cercanos (± 100 kb) a los sitios de inicio de transcripción (TSS). **B.** Solapamiento entre picos de RXR en presencia o ausencia de LG268 ($1 \mu\text{M}$ durante 1 h) y p65 cercanos a TSS de genes reprimidos por LG268 en macrófagos peritoneales (loci p65-RXR) encontrados en experimentos de ChIP-Seq. **C.** Medida de la intensidad de unión de RXR en los loci p65-RXR. Se cuantificó el número de lecturas de secuencia (Tags) del ChIP-Seq de RXR en los loci p65-RXR en presencia o ausencia de ligando. **D.** Porcentaje de TSS de genes regulados por LG268 asociados a los loci p65-RXR. **E.** Heatmap que representa las tags de los ChIP-Seq de p65, RXR y PPAR γ cuantificadas alrededor de los sitios p65-RXR (± 2 kb). **F.** Solapamiento de picos de PPAR en macrófagos WT y RXR $\alpha\beta$ DKO en los loci p65-RXR (loci p65-RXR-PPAR). **G.** Intensidad de unión de PPAR en 65 sitios p65-RXR-PPAR γ encontrados en células RXR $\alpha\beta$ DKO medida como tags por pico, en presencia o ausencia de Rosi o LG268 ($1 \mu\text{M}$ durante 1 h en ambos casos). *** $p \leq 0,001$. Prueba U de Man Whitney.

4.2.7. PPAR γ y LXR dependen de RXR en transrepresión

Hasta el momento se han descrito en la literatura los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR sin profundizar en el papel que RXR pudiera desempeñar en ellos^{53,54}. En el presente trabajo se ha demostrado que el ligando de RXR transreprime la expresión de genes pro-inflamatorios y que existe una relación funcional estrecha entre RXR y PPAR γ en la represión de la transcripción dependiente de LG268. Además, se ha observado como la unión de PPAR γ a sitios de unión de p65 es dependiente de RXR. Por ello, se decidió explorar el posible papel modulador de RXR en la actividad transrepresora de PPAR γ y LXR. Para ello, se seleccionaron genes reprimidos significativamente por los ligandos de PPAR γ o LXR (Rosi y GW3965 respectivamente) empleando los resultados del análisis realizado en la Figura 18A. Se realizó un agrupamiento de los genes transreprimidos por Rosi o GW3965 por similitud en el patrón de expresión en macrófagos WT, RXR $\alpha\beta$ DKO y PPAR γ KO o LXR $\alpha\beta$ DKO respectivamente (Figura 20A y B). Se observó que un número significativo de genes inducibles por KLA y reprimidos por Rosi recuperaron su nivel de expresión total o parcialmente en ausencia de RXR (Figura 20A, *clusters* 1-4). De igual manera, la mayoría de estos genes dejaron de estar reprimidos por Rosi en ausencia de PPAR γ , confirmando la especificidad del tratamiento. Algo similar ocurrió en el caso de la represión mediada por LXR. El efecto represor de GW3965 se perdió en ausencia de RXR en un número elevado de genes (Figura 20B, *clusters* 1-4). La mayoría de genes transreprimidos por LXR recuperaron el nivel de expresión inducida por KLA en células LXR $\alpha\beta$ DKO. Estos resultados sugieren que los heterodímeros RXR/PPAR γ y RXR/LXR son las unidades transcripcionales responsables de los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR respectivamente, para los que RXR es esencial.

Se seleccionaron ciertos genes para validar mediante qPCR los resultados del análisis genómico. Se emplearon células WT y RXR $\alpha\beta$ DKO estimuladas con LPS en presencia o ausencia de los ligandos de cada RN. Los macrófagos se trataron también con LG268 para confirmar la especificidad de este ligando al perder su efecto en las células RXR $\alpha\beta$ DKO. El tratamiento con Rosi o LG268 suprimió la expresión de los genes diana de PPAR γ (*Nos2*, *Cox2*, *Ccl17* y *Csf2*) (Figura 21A y B) en macrófagos WT, pero no se produjeron cambios en células RXR $\alpha\beta$ DKO. El ligando específico de RXR también reprimió genes diana de LXR (*Nos2*, *Cox2*, *Serpin2b* y *Pdpm*) (Figura 21A y C). Sin embargo, el tratamiento con el ligando de LXR, GW3965, o con LG268 no produjo ningún efecto en ausencia de RXR como ocurrió en el caso de PPAR γ . Estos resultados confirman el papel esencial de RXR en el mecanismo de transrepresión de PPAR γ y LXR.

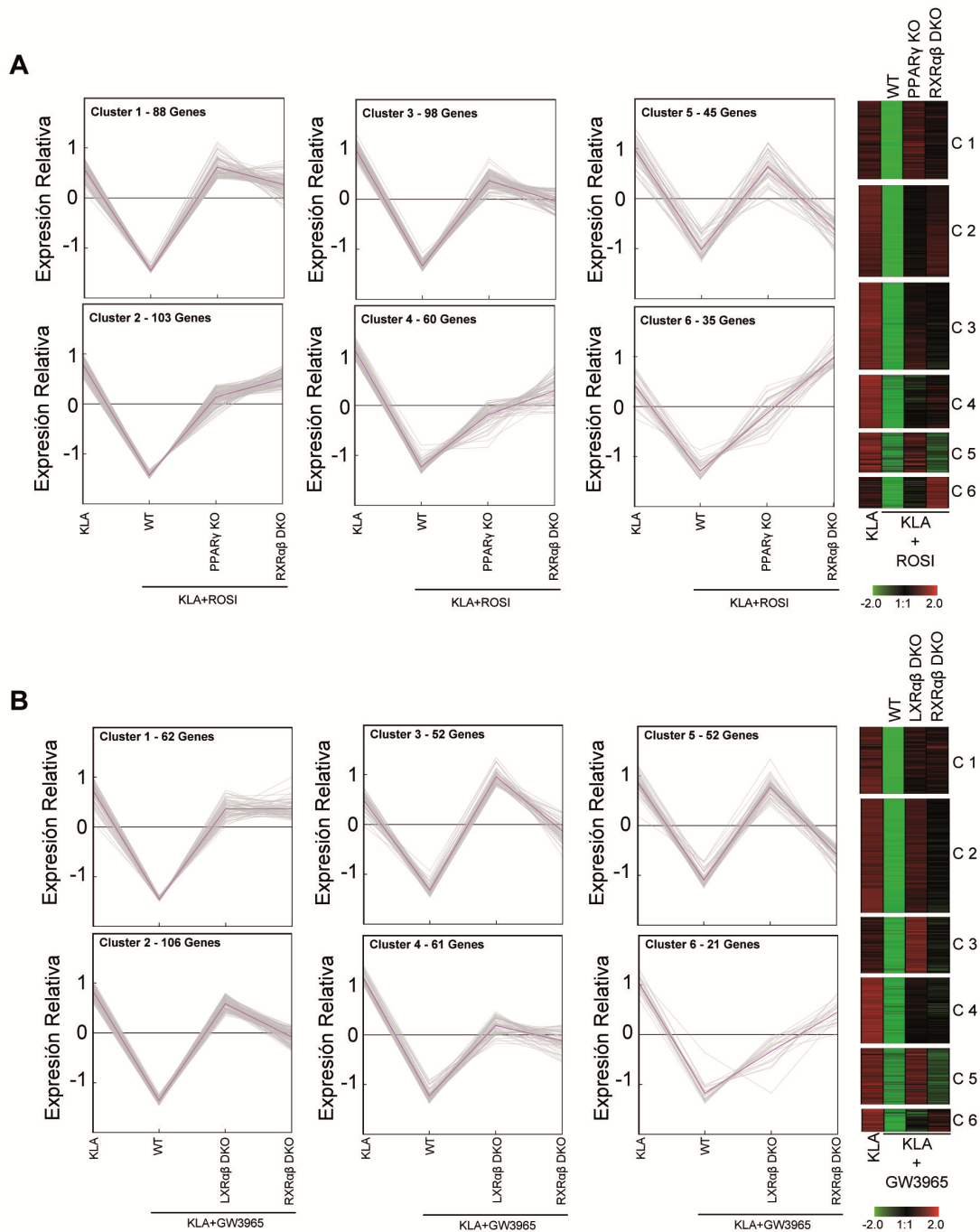


Fig 20. Los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR dependen de RXR. A. Patrón de expresión en macrófagos peritoneales WT, PPAR γ KO y RXR $\alpha\beta$ DKO de genes dependientes de LPS estimulados con KLA (5 ng/mL) y reprimidos en presencia de Rosi (1 μ M). **B.** Patrón de expresión en macrófagos peritoneales WT, LXR $\alpha\beta$ DKO y RXR $\alpha\beta$ DKO de genes dependientes de LPS estimulados con KLA (5 ng/mL) y reprimidos en presencia de GW3965 (1 μ M). Las células se preincubaron con los ligandos durante 18 h seguido de tratamiento con KLA durante 6 h. Los genes reprimidos se eligieron entre aquellos inducidos ≥ 2 veces por KLA y reprimidos significativamente por el ligando respecto a células tratadas solo con KLA (p ajustada $\leq 0,05$). Se realizó agrupamiento por *k-means* para separar los genes en clusters con patrón de expresión similar. Los *heatmap* representa el Z-score de los genes en cada condición experimental señalada, rojo: incremento de expresión, verde: descenso de expresión.

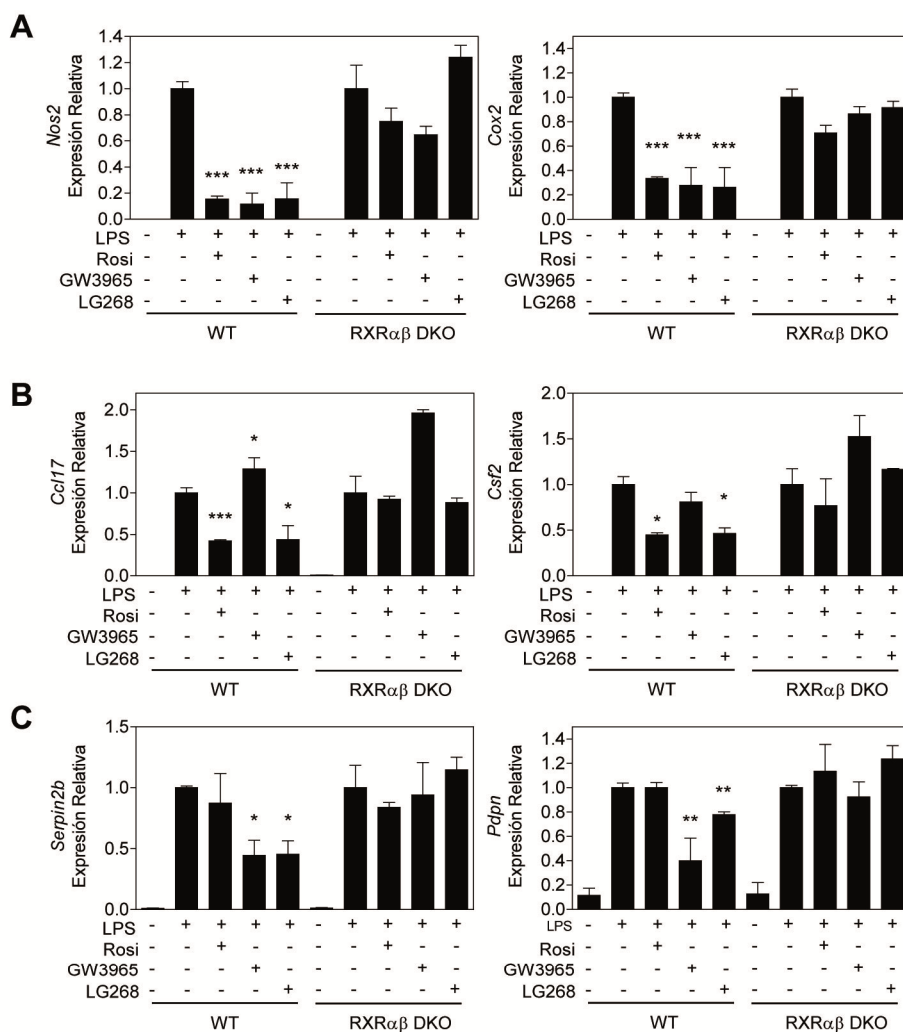


Fig 21. La transrepresión de genes diana de PPAR γ y LXR se pierde en macrófagos RXR $\alpha\beta$ DKO. Expresión de genes diana de RXR, PPAR γ y LXR (A), RXR y PPAR γ (B), y RXR y LXR (C) en macrófagos peritoneales WT y RXR $\alpha\beta$ DKO tratados con LPS (100 ng/mL) en ausencia o presencia de los ligandos de PPAR γ (Rosi, 1 μ M), LXR (GW3965, 1 μ M) y RXR (LG268 (1 μ M). Los valores son medias \pm SEM de triplicados de un experimento representativo de al menos dos experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; prueba *t-Student* pareada.

4.2.8. Efecto anti-inflamatorio de 9cis-RA en un modelo murino de dermatitis

Para explorar los efectos de la regulación negativa de genes pro-inflamatorios dependiente de RXR *in vivo* se examinó el efecto de uno de sus ligandos, 9cis-RA, en un modelo de inflamación aguda. Se utilizó un modelo murino de dermatitis. Las orejas de ratones Swiss se trataron por vía tópica con acetato 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en presencia o ausencia de 9cis-RA. El grosor de las orejas aumentó con TPA, y este efecto se redujo con el tratamiento con 9cis-RA (Figura 22A). Así mismo, el edema producido por el TPA medido como ganancia en peso con respecto a una oreja no tratada se redujo de forma similar al tratamiento con indometacina, un conocido anti-inflamatorio (Figura 22B). La actividad de la enzima mieloperoxidasa en homogeneizados de dichas orejas se redujo significativamente por el tratamiento con

9cis-RA de manera similar a la indometacina (Figura 22C). Esta enzima se encuentra principalmente en neutrófilos y es un indicador de la infiltración de estas células. Todo ello confirma el efecto anti-inflamatorio de 9cis-RA *in vivo*.

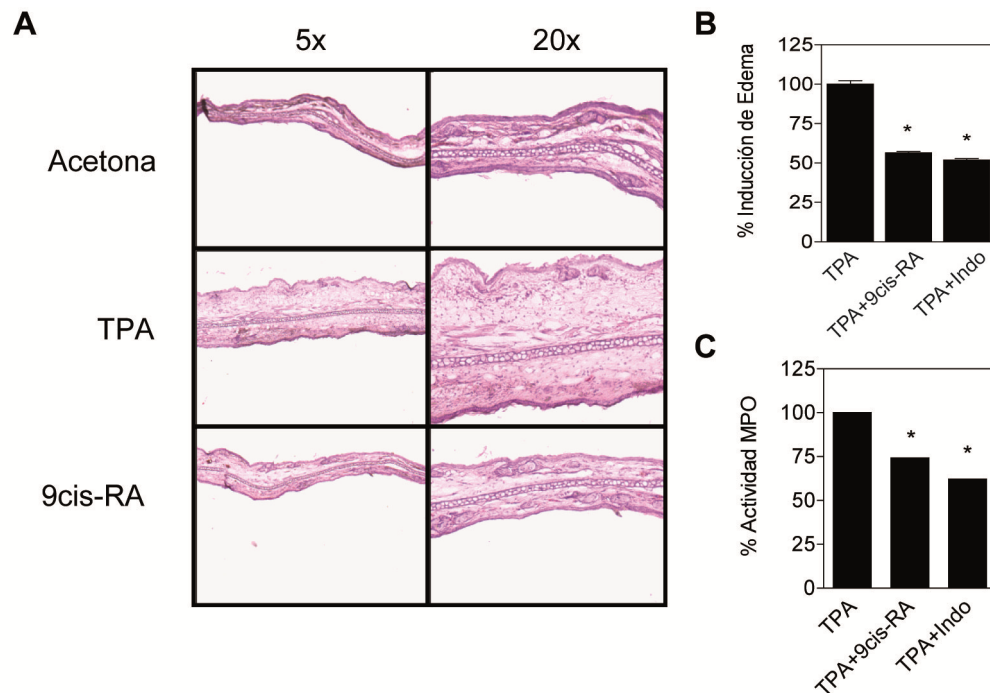


Fig 22. Efecto anti-inflamatorio de 9cis-RA *in vivo*. **A.** Corte histológico de oreja de ratón teñido con hematoxilina-eosina. Cada oreja fue tratada con el vehículo (acetona), TPA (1,25 μ g/10 μ L) o 9cis-RA (0,125 mg/10 μ L) mediante aplicación tópica durante 4 h. **B.** Porcentaje de edema medido en fragmentos de tejido de A. **C.** Actividad MPO en homogeneizados de las muestras de A. Los datos son medias \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$; prueba *t-Student*.

5. DISCUSIÓN

RXR es un factor clave para el correcto funcionamiento de un amplio grupo de RN implicados en diversas funciones fisiológicas. Muchos de estos receptores tienen un papel importante como mediadores entre el metabolismo y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la función de RXR en la regulación de la respuesta inmune ha sido poco explorada. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que RXR es un regulador versátil de la respuesta inflamatoria en macrófagos, ya que está implicado tanto en el inicio y como en la resolución del proceso inflamatorio. Para ello RXR regula la expresión de genes clave en la respuesta inflamatoria del macrófago por transactivación y por transrepresión (Figura D1). Por un lado, los homodímeros de RXR α contribuyen al inicio de la inflamación mediante la transactivación de quimioquinas que promueven la migración leucocitaria. Por otro lado, RXR α participa en la resolución de la inflamación mediante la inducción de receptores de membrana y opsoninas que facilitan la fagocitosis de partículas apoptóticas, y la transrepresión de genes diana de NF κ B, lo que favorece el fenotipo anti-inflamatorio del macrófago. En macrófagos primarios, RXR es necesario para la transrepresión dependiente de PPAR γ y viceversa. Estos receptores actúan como heterodímero permisivo, ya que la activación de RXR o PPAR γ promueve la transrepresión de un conjunto de genes pro-inflamatorios. Ello sugiere que la fagocitosis de células apoptóticas favorece la transrepresión dependiente de RXR α /PPAR γ , probablemente por ligandos endógenos generados durante la digestión de dichas células. RXR también es necesario para la transrepresión dependiente de LXR, aunque el heterodímero que forman no se activa por rexinoides. Además, existen evidencias obtenidas en estudios *in vitro* de un mecanismo de transrepresión mediado por homodímeros de RXR α , aunque no se ha detectado en células primarias. Todo ello sugiere que RXR contribuye al cambio de fenotipo del macrófago y cumple un papel importante en el control de la inflamación.

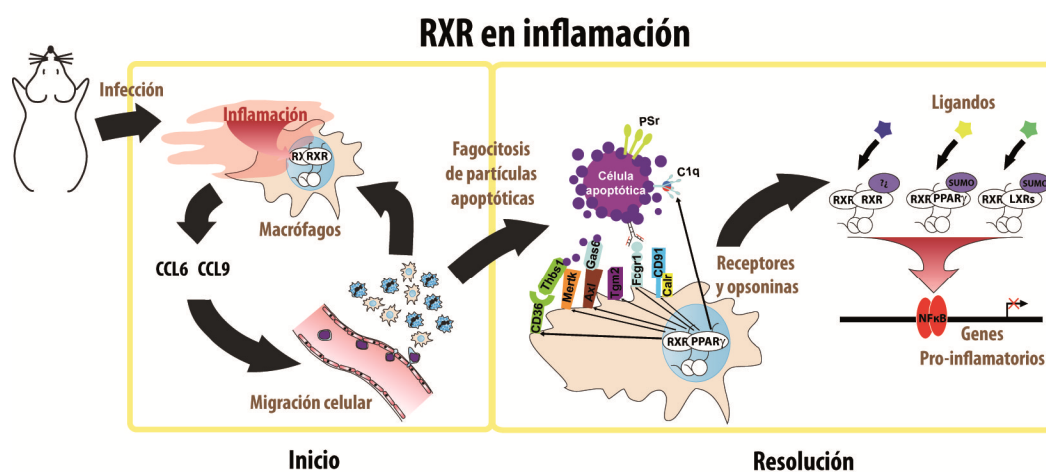


Fig D-1. Esquema resumen de las funciones de RXR en la respuesta inflamatoria.

5.1. Control de la expresión de quimioquinas relevantes en el inicio del proceso inflamatorio por homodímeros de RXR α

Uno de los primeros acontecimientos en el inicio de la inflamación es la activación de los macrófagos presentes en el tejido por un estímulo pro-inflamatorio. Estos macrófagos activados generan quimioquinas que favorecen la movilización leucocitaria hacia la zona de inflamación para establecer la respuesta celular al patógeno o al daño tisular. Aunque hay evidencias de que ciertos RN cumplen un papel en la respuesta inflamatoria del macrófago^{169,209}, existen pocos ejemplos de quimioquinas controladas directamente por RN. Por ejemplo, el ácido retinoico induce la expresión de *Ccl2* (*Mcp1*) en líneas celulares monocíticas humanas y en monocitos primarios *in vitro*, pero la relevancia de este hallazgo *in vivo* no está clara²¹⁰. Los resultados presentados indican que las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9* están controladas específicamente por RXR α en macrófagos y responden al tratamiento con rexinoides. La eficacia de la respuesta inflamatoria temprana frente a una agresión depende de la correcta comunicación entre las células leucocitarias. CCL6 y CCL9 son quimioquinas del grupo CC reconocidas por los macrófagos, las células CD11b⁺, las células B, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y los eosinófilos^{126,129,211}. Estas quimioquinas se han descrito en varios síndromes inflamatorios pero su regulación transcripcional no había sido caracterizada hasta ahora¹²⁹⁻¹³¹. En el presente trabajo se describe como los homodímeros de RXR α regulan la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* a nivel transcripcional, a través de su unión específica a un elemento DR-1 presente en los promotores de estas quimioquinas. Los ensayos de luciferasa realizados con estos promotores muestran que sólo los ligandos de RXR inducen su actividad, y en células primarias no se observaron cambios en la expresión de estos genes en respuesta a ligandos de PPAR o LXR. Los receptores PPAR también reconocen elementos DR-1 y hay evidencias de que los homodímeros de RXR pueden controlar ciertos genes diana de PPAR⁶⁵. Sin embargo, en el caso de *Ccl6* y *Ccl9*, la ausencia de respuesta a ligandos de distintas isoformas de PPAR, sugiere que la regulación de estos genes depende exclusivamente de RXR α . Es poco probable que otros RN participen en la regulación de estas quimioquinas, ya que en los macrófagos no se ha descrito otro receptor, además de PPAR, que reconozca elementos DR-1 y que forme heterodímeros permisivos con RXR α capaces de responder a rexinoides^{20,169}. Otro dato que apoya el papel de RXR como regulador de *Ccl6* y *Ccl9* es que la inducción de su expresión por 9cis-RA y LG268 es antagonizada por LG754, lo que también sugiere que RXR actúa como homodímero.

Los estudios publicados por nuestro laboratorio⁹⁸ muestran que en ratones RXR α KO, se produce un déficit de migración leucocitaria a focos de inflamación en modelos de peritonitis aséptica inducida por tioglicolato. Este fenotipo va acompañado por un descenso en la expresión de CCL6 y CCL9 en estos ratones. A pesar de que la activación de PPAR γ no regula la expresión de estos genes, este receptor podría ser necesario para la función de RXR α con el que heterodimeriza. Sin embargo la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* no se ve alterada en macrófagos de ratones PPAR γ KO comparado con los WT. De igual manera, no se encontraron diferencias en la migración leucocitaria entre ratones PPAR γ KO y sus controles en un modelo de peritonitis con tioglicolato. La ausencia de fenotipo en este modelo de inflamación aguda contrasta con estudios anteriores en los que se ha observado que PPAR γ regula negativamente la expresión de ciertas citoquinas en modelos de inflamación crónica^{170,183,212}. En este sentido, puede que la ausencia de PPAR γ no tenga efecto en el modelo de respuesta aguda porque en la etapa temprana de la respuesta no se produzcan ligandos endógenos de PPAR γ necesarios para que se active, o porque los monocitos y los macrófagos residentes que inician la respuesta no expresen suficiente PPAR γ para reprimir la expresión de las citoquinas en los ratones WT^{183,213}. En todo caso, la ausencia de fenotipo en ratones PPAR γ KO descarta a PPAR γ como mediador en el fenotipo encontrado en ratones RXR α KO.

El defecto en migración encontrado en los ratones RXR α KO está vinculado con un defecto en la expresión de *Ccl6* y *Ccl9* en macrófagos. Los ensayos de migración *in vitro* apoyan esta relación entre bajos niveles de CCL6 y CCL9 con un descenso en la migración leucocitaria. Se ha observado que se produce menor migración celular en ensayos *in vitro* en respuesta a exudados peritoneales procedentes de ratones RXR α KO. Este defecto en la migración también se produce cuando se neutralizan las quimioquinas CCL6 y CCL9 presentes en un exudado de ratón WT mediante incubación con anticuerpos específicos. La capacidad de migración celular también podría verse afectada por la ausencia de RXR α , lo que explicaría el déficit de migración *in vivo*. Sin embargo, los macrófagos KO no mostraron ninguna alteración en su capacidad de migración frente a estímulos como el MCP1 o los mismos CCL6 y CCL9; por lo que la respuesta a quimioquinas parece funcionar correctamente en células RXR α KO. Todo ello sugiere que los cambios en los niveles de estas quimioquinas pueden justificar el fenotipo en migración leucocitaria descrito en ratones RXR α KO.

5.2. RXR α y la respuesta del organismo a la sepsis

En los procesos inflamatorios causados por patógenos, una escasa respuesta celular puede derivar en una infección sistémica que provoque una respuesta inflamatoria generalizada y se produzca la sepsis o shock séptico¹³⁹. Durante la sepsis se activa de manera descoordinada la respuesta humoral y la celular del sistema inmune. Esta respuesta sistémica descontrolada da lugar, entre otras patologías, a la coagulación intravascular diseminada por la que los vasos sanguíneos quedan obstruidos por trombos pudiendo producirse la muerte del organismo por fallo multiorgánico²¹⁴. Para comprobar si RXR α juega un papel en el desarrollo del shock séptico, se realizaron modelos de peritonitis en ratón utilizando el inmunógeno LPS o mediante una infección polimicrobiótica provocada por CLP. En ambos modelos se produjeron menores niveles de CCL9 en plasma. En el modelo de CLP se encontró además una menor expresión de CCL6 en la cavidad peritoneal. Los niveles de CCL6 no pudieron medirse en el modelo de LPS ya que, a diferencia de CCL9, esta quimioquina no se induce en respuesta a LPS²¹⁵. Estos cambios en la expresión de estas quimioquinas reguladas por RXR α van acompañados de una mejora en la supervivencia en ambos modelos de sepsis. La protección contra la sepsis en ratones RXR α KO se justifica porque el déficit en la migración leucocitaria provocada por la baja expresión de CCL6 y CCL9 ralentiza la respuesta celular del sistema inmune. Por ello, la respuesta inflamatoria es menos intensa, de tal manera que se reducen los efectos nocivos en el organismo derivados de la activación excesiva de los mecanismos de defensa del sistema inmune. En este caso, una menor actividad celular supone una ventaja en la supervivencia al shock séptico. De hecho, se ha descrito que los ratones con deficiencia en el receptor CCR1 (receptor de CCL6 y CCL9) también se ven protegidos frente a la sepsis inducida por CLP²¹⁶. También es posible que el defecto en CCL6 y CCL9 sea la causa del leve descenso en MCP1 observado en el modelo de CLP, y que ello potencie el fenotipo.

5.3. La resolución de la inflamación en macrófagos inducida por partículas apoptóticas a través de RXR α y PPAR γ

Recientemente se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) son capaces de activar a RXR⁷⁴. Estos lípidos podrían tener importancia en la activación de RXR durante los procesos inflamatorios, ya que los macrófagos producen PUFA en respuesta a LPS (www.lipidmaps.org). Otra fuente de PUFA, así como de retinoides, colesterol y otros metabolitos lipídicos son las partículas apoptóticas fagocitadas por los macrófagos durante el proceso inflamatorio^{217,218}. Ya se ha descrito como otros receptores se encuentran regulados por estas partículas. Por ejemplo, PPAR γ une covalentemente subunidades SUMO en macrófagos que han digerido partículas apoptóticas, lo cual es un paso esencial en el mecanismo de transrepresión de PPAR γ ²¹⁹. Estas partículas apoptóticas provienen principalmente de neutrófilos movilizados a la zona de inflamación que entran en apoptosis cuando dejan de ser funcionales.

Las partículas apoptóticas inducen el fenotipo anti-inflamatorio en el macrófago, lo que favorece el comienzo de la fase de resolución de la inflamación²²⁰. La regulación de esta fase es muy importante, ya que una respuesta inmune prolongada en exceso puede causar diversas patológicas como artritis, diabetes, fibrosis, o cáncer. Estas derivan de la exposición continuada a los factores que se liberan durante la inflamación para la destrucción del patógeno y que también son perjudiciales para el huésped como son ROS y NOS²²¹. El modo en el que las partículas apoptóticas favorecen el cambio de fenotipo en el macrófago aún no está claro¹⁵². Los resultados mostrados sugieren que RXR α tiene un papel clave en este proceso, ya que regula la expresión de los genes anti-inflamatorios *Tgfb1*, *Il10*, *Slam* y *Mrc1* inducidos por partículas apoptóticas en macrófagos. Asimismo, RXR α es necesario para la inhibición de genes pro-inflamatorios como *Il12 β* , *Il6*, *Nos2* y *Tnf α* dependiente de partículas apoptóticas. También se comprobó que PPAR γ regula la expresión de receptores y opsoninas dependiente de RXR α , lo que sugiere que ambos RN participan en un mecanismo común en respuesta a ATs. Resultados posteriores publicados recientemente¹⁸⁰ muestran que el heterodímero RXR α /PPAR γ es la unidad transcripcional responsable de la transactivación de estos genes. En el caso de los genes reprimidos, PPAR γ podría estar actuando mediante el mecanismo de transrepresión^{53,183}; sin embargo, aún no se ha descrito un mecanismo por el que RXR α reprima la expresión génica que pudiera explicar los resultados de nuestro estudio. Trabajos anteriores describen como PPAR γ se sumoila en respuesta a células apoptóticas en macrófagos y bloquea la liberación de correpresores de los promotores

de genes diana de NFκB²¹⁹. En algunos trabajos previos se ha sugerido que RXR participa en el efecto anti-inflamatorio de otros RN, sobretodo en el sistema nervioso, pero no se ha analizado el mecanismo molecular que provoca este efecto²²²⁻²²⁵.

RXRα y PPARγ no sólo coordinan la resolución de la inflamación induciendo el fenotipo anti-inflamatorio en el macrófago, también protegen frente a la pérdida de auto-tolerancia inmunológica, ya que los receptores y opsoninas inducidos facilitan la eliminación de las partículas apoptóticas acumuladas. Con ello se aumenta la generación de ligandos endógenos a partir de la digestión de las partículas apoptóticas lo que contribuye a estimular el mecanismo de transrepresión de RXRα y PPARγ, potenciando así la polarización al fenotipo anti-inflamatorio. Podría plantearse que los efectos sobre la expresión génica asociados a RXRα y PPARγ se produjeran por regulación indirecta mediante otros genes diana. Sin embargo, los datos publicados posteriormente descartan esta posibilidad¹⁸⁰. Se demostró la unión de RXRα y PPARγ en los promotores de genes activados en presencia de partículas apoptóticas mediante ChIP, lo que sugiere que estos están regulados directamente por el heterodímero RXRα/PPARγ. En este contexto, no se pudo confirmar que la transrepresión dependiente de RXRα y PPARγ inducida por células apoptóticas se produjese a través del heterodímero. Los datos obtenidos en el presente trabajo, indican que en macrófagos primarios se produce transrepresión por el heterodímero RXR/PPARγ, por tanto este podría también mediar el efecto represor de las partículas apoptóticas de genes anti-inflamatorios.

5.4. Efecto represor de la inflamación del tratamiento con rexinoides

La posible existencia de un mecanismo de inhibición de la respuesta inflamatoria específico de RXR es interesante, porque podría convertirse en una nueva diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis, la diabetes o Alzheimer. La capacidad de RXR para inhibir otras vías de señalización celular aún no ha sido explorada. Los datos presentados indicaban que RXR inhibe la respuesta inflamatoria en macrófagos en respuesta a partículas apoptóticas. Para profundizar en el mecanismo dependiente de RXR a través del que se produce esta represión, se realizó un análisis del efecto de los ligandos de RXR sobre la activación de los macrófagos por LPS. Se observó la represión de genes pro-inflamatorios en respuesta al retinoide 9cis-RA y al rexinoide LG268. LG268 sólo activa a RXR, a diferencia de 9cis-RA, que también puede activar al receptor RAR²²⁶. Cuando se comparó la represión mediada por ambos ligandos se observó que algunos de los genes pro-inflamatorios estudiados sufrieron un incremento en su expresión en

respuesta a 9cis-RA. Este aparente efecto pro-inflamatorio de 9cis-RA podría deberse a la activación de RAR como se ha sugerido²²⁷. Para asegurar la especificidad del estudio de la actividad de RXR optó por utilizar LG268 para los ensayos posteriores.

Existen evidencias del efecto anti-inflamatorio de ciertos retinoides^{228,229}, pero el presente trabajo es el primero en señalar que la activación específica de RXR por rexinoides provoca una represión transcripcional. En macrófagos, estos rexinoides pueden activar homodímeros de RXR o heterodímeros permisivos como los que forman PPAR γ , LXR o Nurr1/Nur77. Por tanto, fue necesario descartar la implicación de estos heterodímeros para definir la función de RXR en el mecanismo de represión dependiente de rexinoides. El estudio se centró en PPAR γ o LXR porque, a diferencia de Nurr1/Nur77, estos son capaces de reprimir la transcripción de genes diana de NF κ B en respuesta a sus ligandos mediante el mecanismo conocido como transrepresión^{230,231}. Se desconoce si RXR cumple algún papel en este mecanismo a pesar de que sí se sabe que RXR es esencial para PPAR γ y LXR en transactivación^{180,232}. En los artículos que han descrito los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR no se profundiza en el posible papel modulador de RXR^{54,204}. Tampoco se ha explorado la posible capacidad de reprimir la transcripción de RXR como monómero o homodímero.

Para explorar el efecto del tratamiento con rexinoides sobre los genes transreprimidos por PPAR γ y LXR se compararon los genes reprimidos en presencia de LG268, Rosi y GW3965 (ligandos de RXR, PPAR γ y LXR respectivamente) en macrófagos activados con LPS. Además, este análisis permitiría discriminar aquellos genes reprimidos específicamente por LG268 y que pudieran estar regulados exclusivamente por RXR. En el análisis de expresión diferencial, se encontró un número muy escaso de genes reprimidos solo por LG268. La mayoría de genes que estaban reprimidos por LG268 también se inhibían en presencia de los ligandos de PPAR γ o LXR. Sin embargo, el rexinoide no mimetizó por completo la represión de PPAR γ o LXR, pues algunos de los genes diana de estos receptores no fueron reprimidos por LG268. El alto grado de solapamiento de genes regulados por LG268 y genes regulados por el resto de ligandos parecía indicar que el rexinoide actúa a través de heterodímeros de RXR con PPAR γ y LXR. A nivel funcional se encontró una gran similitud entre los genes reprimidos por LG268 (enriquecidos en funciones biológicas relacionadas con la respuesta inmune); sin embargo, el grupo de genes diana de PPAR γ y LXR no regulados por RXR no parecían participar en funciones biológicas comunes. Esto implica que la sensibilidad a LG268 caracteriza a genes relacionados funcionalmente entre sí incluso entre genes diana de PPAR γ y LXR. Los

genes que comparten funciones biológicas tienden a estar regulados por los mismos factores, lo que sugiere que para ciertos genes regulados por PPAR γ o LXR este elemento común regulador podría ser RXR. La existencia de genes diana de PPAR γ y LXR que no responden a LG268 no implica que estos genes se regulen por una vía distinta al heterodímero permisivo. Existen evidencias de que la permisividad del heterodímero no implica una equivalencia entre los efectos de los ligandos de RXR y su compañero de heterodímero. Los genes diana de un receptor regulados de manera permisiva pueden variar dependiendo del tipo celular, la presencia de cofactores y otras variables⁸³. En un estudio reciente de la permisividad de los heterodímeros RXR/PPAR γ y RXR/LXR en transactivación se comprobó que el tratamiento con un ligando de RXR no reproduce totalmente el patrón de expresión generado por Rosi o GW3965 en células dendríticas⁸². Basándose en la capacidad de RXR y los otros RN de reclutar ciertos corre reguladores de manera específica²³³, los autores sugieren que la permisividad es específica para cada gen y es diferente de un tipo celular a otro dependiendo del grupo de cofactores que se expresan en cada célula. Por ello, la regulación parcial del programa de represión de PPAR γ y LXR por LG268 podría deberse a la presencia o ausencia de ciertos cofactores necesarios para la represión de los genes regulados por cada heterodímero. Sin embargo, también existen ejemplos en la literatura de solapamiento en la regulación de genes diana de distintos receptores que no heterodimerizan entre sí²⁰⁴, lo cual sería también compatible con los resultados presentados e implicaría que RXR regula de manera independiente un programa transcripcional que incluye genes diana de PPAR γ y LXR. Para poder identificar si el mecanismo de represión transcripcional de RXR depende o no a PPAR γ o LXR fue preciso explorar el efecto de LG268 en ausencia de estos compañeros de heterodímero.

5.5. Características del mecanismo de transrepresión de los homodímeros de RXR α

Para explorar la represión transcripcional por rexinoides en ausencia de PPAR γ y LXR se realizaron ensayos de luciferasa en la línea células *Raw 264.7*, en los que se analizó la regulación transcripcional de promotores aislados. Existe cierta variabilidad en la expresión de RN entre clones de esta misma línea celular. Por ello, en primer lugar fue preciso comprobar la ausencia de PPAR γ y LXR en estas células, analizando la transactivación de vectores reporteros de luciferasa específicos de estos receptores en respuesta a sus ligandos. En el caso del clon utilizado en estos estudios, la respuesta a cada ligando específico sólo se produjo cuando el receptor

correspondiente fue sobreexpresado. Ello permitió demostrar por primera vez la capacidad de represión transcripcional de RXR α activado por LG268 descartando la implicación de PPAR γ o LXR.

La ausencia de HRE en los promotores de los genes reprimidos por LG268 descrito en el estudio de los resultados obtenidos en el análisis de expresión diferencial, apuntaba a la posibilidad de que la inhibición se produjese con independencia de la unión al ADN. El mutante de RXR α deficiente en la unión al ADN permitió confirmar esta teoría, ya que conservó la capacidad de reprimir. Por ello, se puede considerar que RXR α inhibe la transcripción por un mecanismo de transrepresión. Para confirmar que el efecto de LG268 es específico de RXR, se utilizó un mutante de este receptor que carece de un fragmento de su LBD. El estudio de la actividad de los RN siempre ha estado unido al estudio de la especificidad de sus ligandos. En ocasiones se han descrito efectos asociados a un ligando que resultaron ser independientes del receptor correspondiente debido a su uso en concentraciones elevadas²³⁴. No es fácil descartar estos efectos inespecíficos, aunque se puede reducir su intensidad utilizando concentraciones más bajas de ligando en los tratamientos¹⁸⁹. El análisis de células deficientes en el receptor o el empleo de versiones truncadas del mismo permiten identificar de manera indirecta los efectos específicos asociados al ligando. El uso de la versión mutada de RXR α (RXR α Δ AF-2) que no une ligando permitió descartar que la represión en respuesta a LG268 observada en los ensayos de luciferasa fuese independiente de RXR α .

RXR se une a otros RN o forma homodímeros para transactivar la expresión de sus genes diana porque los HRE que reconoce tienen dos motivos de unión. Puesto que no se une al ADN para transreprimir, RXR α podría estar actuando como monómero u homodímero. RXR también puede formar tetrámeros pero estos son inestables en presencia de ligando, y por ello la forma predominante cuando RXR está activo son los homodímeros. Empleando mutantes que reducen o impiden la dimerización de RXR α se llegó a la conclusión de que la homodimerización de RXR α es necesaria para transreprimir la expresión de genes dependientes de LPS.

Existen diversos mecanismos de transrepresión por los que RXR podría actuar sin interactuar con el ADN⁴⁹. PPAR γ y LXR transreprimen la expresión de genes diana de NF κ B bloqueando la liberación del complejo represor localizado en sus promotores. PPAR γ y LXR transreprimen mediante el mismo mecanismo aunque empleando rutas paralelas de sumoilación⁵⁴. Por tanto, es probable que RXR también dependa de esta modificación post-traducciona para transreprimir. Esta posibilidad se analizará en futuros estudios del mecanismo de transrepresión de RXR. Yasutomi

Kamei y colaboradores describieron que GR y RAR transreprimen mediante un mecanismo dependiente de coactivadores⁵⁰. En este mecanismo, la unión de los coactivadores al RN activado reduce las posibilidades de que los otros factores inicien la transcripción de manera eficiente, lo que se traduce en una inhibición de la expresión de sus genes diana. En el caso de RXR α , la ausencia de reclutamiento de coactivadores por parte de una versión mutada de RXR α no impide que se produzca la transrepresión de promotores pro-inflamatorios. Asimismo, la sobreexpresión de los coactivadores SRC1 y CBP, que son necesarios para la transcripción dependiente de NF κ B y de RXR α , no alteró la represión en presencia de LG268. Sin embargo, se observó un incremento en la transcripción probablemente por el aumento en la probabilidad de unión de estos coactivadores al promotor. Por tanto, se puede descartar que la unión a coactivadores forme parte del mecanismo de transrepresión de RXR α .

5.6. Permisividad del mecanismo de transrepresión dependiente de RXR y PPAR γ

Para analizar el mecanismo de transrepresión de RXR en células primarias, se emplearon macrófagos deficientes en cada uno de estos compañeros del heterodímero de RXR. En ellos se identificaron los efectos de LG268 asociados a cada RN analizando la represión en respuesta al ligando de RXR en ausencia de cada uno de ellos. La ausencia de LXR en macrófagos peritoneales no tuvo efecto sobre la represión de la mayoría de genes regulados por LG268, lo que apoyaba la existencia *in vivo* del mecanismo de transrepresión específico de RXR encontrado *in vitro*. Sin embargo la ablación de PPAR γ redujo o anuló la represión génica asociada al tratamiento con LG268. Este resultado va en contra de los datos obtenidos *in vitro*, que apuntan a la existencia de un mecanismo de transrepresión específico de los homodímeros de RXR. Ello sugiere que en macrófagos primarios el principal mecanismo de transrepresión de RXR es dependiente de PPAR γ , mediante la activación del heterodímero permisivo RXR/PPAR γ . Probablemente, en la célula coexistan ambos mecanismos dependientes de RXR, con y sin intervención de PPAR γ . Para explicar por qué el mecanismo específico de RXR descrito *in vitro* no se observa en macrófagos primarios deficientes en PPAR γ es preciso tener en cuenta las características de dimerización de RXR. En presencia de otros RN, RXR responde a sus ligandos formando heterodímeros de manera predominante; y en ausencia de otros receptores, la mayoría del RXR disponible unido a ligando forma monómeros u homodímeros⁹⁷. En macrófagos primarios se expresan diversos receptores que

heterodimerizan con RXR, por tanto, la formación de homodímeros de RXR en respuesta a LG268 esta desfavorecida frente a la formación de heterodímeros, incluso en macrófagos deficientes en PPAR γ . Aunque RXR pueda transreprimir por sí mismo, la escasa disponibilidad de RXR libre haría que este mecanismo no fuera detectable en células primarias. En cambio, en las células *Raw 264.7*, en las que RXR se sobreexpresó artificialmente, la actividad del homodímero de RXR en transrepresión sí se hace patente. La estrecha relación entre RXR y PPAR γ observada en transrepresión explica el amplio solapamiento de los genes reprimidos por el ligando de RXR con los reprimidos por PPAR γ . La ausencia de transrepresión en respuesta a Rosi en macrófagos deficientes en RXR apoya la permisividad del heterodímero RXR/PPAR γ en transrepresión. A pesar de que se ha demostrado que el heterodímero RXR/LXR es permisivo en transactivación⁸³, esta característica no se cumple en transrepresión, ya que la ausencia de LXR no tiene efecto sobre la transrepresión mediada por rexinoides. Ello explica a su vez el escaso número de genes reprimidos específicamente por LG268 y GW3965. Sin embargo, los estudios realizados en este trabajo en ratones RXR $\alpha\beta$ DKO indican que LXR sí depende de RXR en transrepresión, sugiriendo que RXR cumple un papel en el mecanismo de transrepresión de LXR pero no al contrario. En este caso, el heterodímero RXR/LXR sería no permisivo en transrepresión, ya que RXR es necesario para que LXR sea funcional pero el complejo no responde a rexinoides. En conjunto, estos resultados sugieren que en macrófagos primarios la transrepresión mediada por LG268 se debe a la actividad del heterodímero RXR/PPAR γ .

La localización de los factores de transcripción en el genoma determina la accesibilidad de estos a los genes que regulan. RXR y PPAR γ se localizan en los sitios de unión de la subunidad p65 de NF κ B en las proximidades de los genes reprimidos por LG268. En estos sitios es donde NF κ B intercambia los correpresores por coactivadores marcando así el inicio de la transcripción de sus genes diana. Según los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR publicados⁴⁹, estos receptores se unen a NF κ B en los loci donde se une p65 para impedir la liberación del complejo represor e inhibir la transcripción. La presencia de RXR sugiere que la interacción con NF κ B es necesaria para que se produzca la transrepresión mediada por este receptor. La presencia de PPAR γ en la mayoría de loci p65-RXR, apoya la dependencia mutua entre ambos receptores observada en el estudio de expresión génica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ensayos de ChIP-Seq ofrecen un resultado sumatorio del conjunto de uniones del factor estudiado en los diferentes loci en el genoma de cada célula incluida en la muestra analizada. Por tanto, no se puede concluir que RXR

y PPAR γ co-localicen en los sitios p65, ya que estos receptores podrían unirse de manera mutuamente excluyente en diferentes células, y al ser analizadas en conjunto, darían como resultado uniones simultaneas falsas en ciertos loci. Sin embargo, la pérdida de unión de PPAR γ en ausencia de RXR no sólo indica que RXR es esencial para estabilizar la unión de PPAR γ en los loci p65-RXR sino que también sugiere que ambos receptores se unen a la vez en estos loci. Sería interesante realizar un reChIP de RXR y PPAR γ para confirmar la existencia de uniones directas entre estos receptores en los sitios p65. En conjunto, el análisis de la distribución de RXR, PPAR γ y p65 asociada a los genes reprimidos por LG268 completa el análisis de expresión diferencial, y apoya el papel de RXR en el mecanismo de transrepresión de PPAR γ .

5.7. Co-localización de RXR y PPAR γ en loci p65 que regulan a los genes reprimidos por rexinoides

La pérdida de la transrepresión dependiente de Rosi en macrófagos deficientes en RXR confirmó la dependencia mutua que existe entre RXR y PPAR γ . El mecanismo descrito en la literatura para PPAR γ ⁵³ es compatible con la necesidad de heterodimerización con RXR. De hecho, como se ha demostrado en el estudio de ChIP-Seq, RXR estabiliza la unión de PPAR γ en los loci de p65. Por tanto, el papel de RXR podría ser el de establecer interacciones con el complejo NCoR u otros cofactores presentes en el promotor del gen reprimido, contribuyendo así a la unión de PPAR γ a estos loci. La permisividad del heterodímero RXR/PPAR γ en transrepresión permitiría que la activación de RXR con rexinoides indujese la sumoilación de PPAR γ , lo que bloquearía el complejo represor (Figura D-2). Sería interesante determinar si RXR también depende de PPAR γ para su unión a sitios p65, puesto que en caso contrario, RXR sería el factor clave que determina los genes que serán transreprimidos por el heterodímero RXR/PPAR γ . Además, en el futuro será necesario confirmar que la transrepresión dependiente de rexinoides se debe a la inducción de la sumoilación de PPAR γ en los sitios p65, como ocurría con Rosi.

En los experimentos de ChIP-Seq, RXR y PPAR γ se encuentran unidos a sitios p65 en ausencia de estímulo inflamatorio o ligando. Este resultado contrasta con lo publicado para *Nos2* en el caso de PPAR γ ⁵³, donde se mostraba que la unión de PPAR γ al promotor de este gen era dependiente del ligando. Sin embargo, en el mismo trabajo, otros genes también reprimidos por PPAR γ mostraban cierta unión basal del receptor en sus promotores. El método de ChIP empleado en el presente trabajo unido a la técnica de secuenciación, aumentan notablemente la sensibilidad de

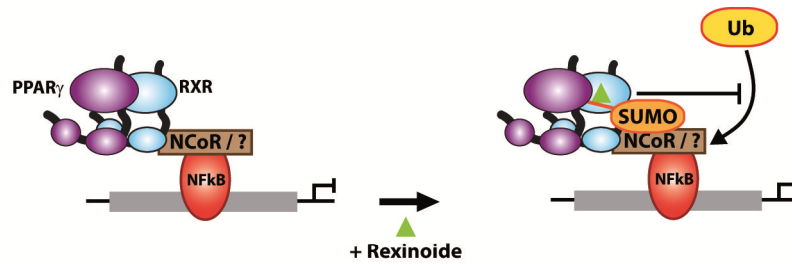


Fig D-2. Modelo propuesto de permisividad del heterodímero RXR/PPAR γ en transrepresión. RXR y PPAR γ se encuentran unidos en estado basal a sitios de unión de NFκB. Esta unión depende de RXR que se une a NCoR u otros factores presentes en el promotor. La presencia de rexinoides en un contexto inflamatorio permite la activación de PPAR que se sumoila e impide la liberación del complejo correpresor, inhibiendo la expresión de genes diana de NFκB.

detección de las uniones de PPAR γ al genoma. Esto hace posible que se puedan observar uniones basales de PPAR γ que antes habrían pasado desapercibidas. Esto explica la observación de que la presencia del ligando no sea necesaria para que haya unión de RXR o PPAR γ en la mayoría de sitios p65 asociados a genes reprimidos, aunque sí sea necesaria para que se produzca la represión. RXR está unido en estado basal a sitios p65 sin unirse directamente al ADN, por tanto, esta unión debe producirse a través de algún factor preexistente en el promotor. PPAR γ se une a estos mismos loci mediante RXR, y está descrito que PPAR γ requiere también de NCoR para unirse a los promotores de los genes que transreprime⁵³. Puesto que NCoR se encuentra unido a sitios p65 en estado basal⁴⁹, es probable que este factor participe en la unión de RXR a las zonas reguladoras en transrepresión. De este modo, PPAR γ heterodimeriza con RXR unido en los promotores diana en estado basal en los sitios p65, una vez presente en el promotor, PPAR γ podría sumoilarse en respuesta a sus ligando o a rexinoides y evitar la liberación del correpresor inducida con LPS. De algún modo, la sumoilación de PPAR γ favorece la estabilización este receptor en el sitio donde ejerce su actividad, ya que la mutación del sitio de sumoilación de PPAR γ que impide la unión del grupo SUMO evita la unión del receptor a sitios p65⁵³. Esto sugiere que aunque RXR es necesario para localizar a PPAR γ en el lugar correcto donde realizar la transrepresión, no es suficiente para mantenerlo unido de manera estable durante la respuesta inflamatoria, para ello es necesario que PPAR γ se sumoile. En el caso de LXR, la presencia de RXR también es necesaria en transrepresión, a pesar de que la ausencia de LXR no tenga ningún efecto sobre la represión mediada por LG268. Este resultado sugiere que LXR también transreprime como heterodímero, pero a diferencia de PPAR γ , no muestra permisividad por el ligando de RXR. El papel de RXR podría ser también, en este caso, el de señalar el loci al que unirse y estabilizar la unión de LXR en los sitios p65.

5.8. Perspectivas de futuro de RXR en la terapia anti-inflamatoria

Sólo el rexinoide bexaroteno está aprobado para su uso como tratamiento, y se emplea frente al linfoma cutáneo de células T¹⁰⁹. Los rexinoides han probado tener menos efectos secundarios que los ligandos de PPAR γ , los cuales se usan en el tratamiento de diabetes pero pueden producir osteoporosis o aumento de peso y de apetito⁷². Los rexinoides promueven la sensibilización a la insulina¹¹³ y recientemente nuestro laboratorio ha descrito como la activación de RXR en el macrófago tiene un papel importante en este efecto anti-diabético. Sin embargo, los efectos secundarios asociados a rexinoides, como son el aumento de triglicéridos en sangre, la falta de apetito o la inducción de hipotiroidismo^{72,114,117}, han frenado el empleo de RXR como diana terapéutica. Muchos de estos efectos adversos se han asociado a la activación de los heterodímeros que RXR forma con otros receptores. Por ello, sería de gran utilidad el desarrollo de rexinoides selectivos capaces de modular ciertas funciones de RXR. Por ello, es importante conocer los mecanismos celulares regulados por los rexinoides. El efecto represor de LG268 sobre la transcripción descrito en este trabajo sugiere que este y otros rexinoides pueden ser utilizados con éxito en tratamientos anti-inflamatorios para enfermedades como la aterosclerosis, la diabetes o el Alzheimer. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la activación de RXR también favorece la inducción de la respuesta inflamatoria a través de la regulación de *Ccl6* y *Ccl9*. Por tanto, el tratamiento con rexinoides podría exacerbar la respuesta inflamatoria a través de la regulación de estas citoquinas. Para comprobar el efecto *in vivo* de la activación de RXR en un contexto inflamatorio se realizó un modelo de dermatitis en oreja utilizando un tratamiento tópico con el ligando 9cis-RA. Las orejas tratadas con 9cis-RA o con el agente anti-inflamatorio indometacina sufrieron un menor edema e infiltración leucocitaria en comparación con el tejido tratado con el vehículo. El resultado sugiere que RXR actúa principalmente como agente anti-inflamatorio *in vivo* en respuesta a 9cis-RA. No se puede descartar que este efecto esté asociado en parte a la actividad de otros receptores a través del heterodímero con RXR o que se deba parcialmente a la actividad de RAR que se une específicamente a 9cis-RA. Será necesario estudiar el efecto *in vivo* de rexinoides, que únicamente activan a RXR, en modelos de enfermedades inflamatorias para determinar si el balance final del tratamiento es un efecto anti-inflamatorio o pro-inflamatorio. Puesto que RXR puede responder en ambos sentidos dependiendo del contexto celular, el efecto resultante dependerá de la suma de efectos de los rexinoides en distintos tipos celulares y contextos fisiológicos en el organismo. Actualmente, existe un gran interés en el desarrollo de moduladores selectivos de RN, capaces de activar solo ciertas isoformas de receptores o heterodímeros⁸³. De hecho,

se han desarrollado algunos rexinoides que activan heterodímeros de manera selectiva¹¹⁸. La descripción del mecanismo de transrepresión del heterodímero RXR/PPAR γ presentado en este trabajo sugiere que un rexinoide diseñado para activar específicamente este heterodímero, podría tener efectos beneficiosos como tratamiento anti-inflamatorio.

En conjunto, los resultados presentados sugieren que RXR cumple un papel relevante en la respuesta inmune que puede modularse mediante el empleo de ligandos. También se han encontrado evidencias de la existencia de un mecanismo de transrepresión por homodímeros de RXR. Sería interesante explorar la posibilidad de activar esta vía de transrepresión en condiciones fisiológicas y comprobar su utilidad como diana en tratamientos anti-inflamatorios. Sin embargo, el estudio de la activación de homodímeros de RXR es complicado en células primarias, ya que los rexinoides también activan a los heterodímeros permisivos de RXR. En el caso del macrófago RXR forma esta clase de heterodímeros principalmente con PPAR γ y LXR, por tanto sería necesario estudiar el efecto del rexinoide en ausencia de estos receptores. Para ello, podrían obtenerse macrófagos primarios deficientes en PPAR γ y LXR mediante silenciamiento por interferencia o por cruce entre ratones deficientes en estos receptores en células mieloides. La caracterización de esta vía permitiría justificar el desarrollo de rexinoides específicos de homodímeros de RXR, que podrían suponer una alternativa a otros fármacos para el tratamiento de enfermedades de origen inflamatorio. La activación específica de homodímeros de RXR permitiría evitar los efectos adversos asociados a la activación de las vías de señalización controladas por heterodímeros permisivos. Sin embargo, será necesario un estudio más completo del balance en el organismo entre el efecto pro-inflamatorio y anti-inflamatorio de los homodímeros de RXR descrito en este trabajo. Los estudios *in vivo* permitirán identificar el probable beneficio terapéutico de la activación de homodímeros de RXR en enfermedades como la diabetes, la aterosclerosis, el Alzheimer, la autoinmunidad o el cáncer.

6. CONCLUSIONES

1. RXR α interviene en el inicio de la respuesta inflamatoria en el macrófago mediante el control transcripcional de las quimioquinas *Ccl6* y *Ccl9*. Los homodímeros de RXR α se unen al promotor de estos genes e inducen su expresión facilitando la migración leucocitaria a focos de inflamación. Esta función pro-inflamatoria de los homodímeros de RXR α contribuye al establecimiento de una respuesta inmunológica excesiva en un contexto de sepsis, lo que promueve el daño multiorgánico que puede causar la muerte del organismo.
2. RXR contribuye al cambio de fenotipo en el macrófago tras la fagocitosis de partículas apoptóticas. RXR facilita la captura de estas partículas induciendo receptores y opsoninas en el macrófago e interviene directamente en la adquisición del fenotipo anti-inflamatorio inhibiendo la expresión de genes pro-inflamatorios en respuesta a dichas partículas. Estos cambios en el macrófago también dependen de PPAR γ lo que sugiere que se producen a través del heterodímero de RXR con PPAR γ .
3. El tratamiento con rexinoides provoca la inhibición del programa inflamatorio en el macrófago. La activación de RXR da lugar a dos posibles mecanismos que reprimen la transcripción de genes diana de NF κ B. Un mecanismo detectado solo en experimentos *in vitro* se produce a través de homodímeros de RXR. En cambio, en macrófagos primarios se observa otro mecanismo en el que RXR transreprime la expresión de sus genes diana a través de heterodímeros formados con PPAR γ . Estos heterodímeros RXR/PPAR γ se localizan en sitios de unión de NF κ B en el genoma y son permisivos al tratamiento con ligandos de ambos receptores en transrepresión.
4. RXR es esencial en los mecanismos de transrepresión de PPAR γ y LXR, que heterodimerizan con RXR para transreprimir en respuesta a sus ligandos específicos. A diferencia de PPAR γ , el heterodímero formado por LXR y RXR no es permisivo al tratamiento con rexinoides en transrepresión.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Evans, R.M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* 19, 1429-1438 (2005).
2. Glass, C.K. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 116, 556-560 (2006).
3. Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839 (1995).
4. Jensen, E.V., and H.I. Jacobson. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 18, 387-414 (1962).
5. Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641 (1985).
6. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139 (1986).
7. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. & Shine, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154 (1986).
8. Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., *et al.* The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640 (1986).
9. Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226 (1997).
10. Nuclear Receptors Nomenclature, C. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161-163 (1999).
11. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964 (2004).
12. Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M. & Mangelsdorf, D.J. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789-799 (2006).

13. Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. & Evans, R.M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652 (1986).
14. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., *et al.* The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 5, 891-897 (1986).
15. Zilliacus, J., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. & Wright, A.P. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4175-4179 (1994).
16. Kininis, M. & Kraus, W.L. A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal* 6, e005 (2008).
17. Ong, C.T. & Corces, V.G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet* 12, 283-293 (2011).
18. Lam, M.T., Cho, H., Lesch, H.P., Gosselin, D., Heinz, S., Tanaka-Oishi, Y., *et al.* Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* (2013).
19. Glass, C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15, 391-407 (1994).
20. Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850 (1995).
21. Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. & Desvergne, B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272, 20108-20117 (1997).
22. So, A.Y., Chaivorapol, C., Bolton, E.C., Li, H. & Yamamoto, K.R. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3, e94 (2007).

23. Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., *et al.* International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58, 760-772 (2006).
24. Weatherman, R.V., Fletterick, R.J. & Scanlan, T.S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem* 68, 559-581 (1999).
25. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704 (2006).
26. Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M. & Mangelsdorf, D.J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870 (2001).
27. Repa, J.J. & Mangelsdorf, D.J. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 10, 557-563 (1999).
28. Burris, T.P., Solt, L.A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., *et al.* Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev* 65, 710-778 (2013).
29. Jin, L. & Li, Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1218-1226 (2010).
30. Lala, D.S., Mukherjee, R., Schulman, I.G., Koch, S.S., Dardashti, L.J., Nadzan, A.M., *et al.* Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature* 383, 450-453 (1996).
31. Schulman, I.G., Li, C., Schwabe, J.W. & Evans, R.M. The phantom ligand effect: allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes Dev* 11, 299-308 (1997).
32. Cesario, R.M., Klausing, K., Razzaghi, H., Crombie, D., Rungta, D., Heyman, R.A., *et al.* The rexinoid LG100754 is a novel RXR:PPARgamma agonist and decreases glucose levels in vivo. *Mol Endocrinol* 15, 1360-1369 (2001).
33. Jepsen, K. & Rosenfeld, M.G. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* 115, 689-698 (2002).
34. Lonard, D.M. & O'Malley, B.W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125, 411-414 (2006).

35. McKenna, N.J., Lanz, R.B. & O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344 (1999).
36. Perissi, V. & Rosenfeld, M.G. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 542-554 (2005).
37. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* 25, 6868-6886 (2006).
38. Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M.G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736 (1997).
39. Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., *et al.* The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684 (1997).
40. Nagy, L., Kao, H., Love, J., Li, C., Banayo, E., Gooch, J., *et al.* Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes and Devel* 13, 3209-3216 (1999).
41. Perissi, S., McInerney, Kurokawa, Kronnes, Rose, Lambert, Milburn, Glass, Rosenfeld. Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes and Development* 13, 3198-3208 (1999).
42. Hu, X. & Lazar, M.A. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96 (1999).
43. Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W. & Rosenfeld, M.G. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511-526 (2004).
44. McKenna, N.J. & O'Malley, B.W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474. (2002).
45. Spiegelman, B.M. & Heinrich, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 119, 157-167 (2004).
46. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121-141 (2000).

47. Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937 (1998).
48. Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., *et al.* Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415, 813-817. (2002).
49. Glass, C.K. & Saijo, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 10, 365-376 (2010).
50. Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., *et al.* A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414 (1996).
51. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24, 488-522 (2003).
52. De Bosscher, K. & Haegeman, G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 23, 281-291 (2009).
53. Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763 (2005).
54. Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., *et al.* Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25, 57-70 (2007).
55. Huang, W., Ghisletti, S., Perissi, V., Rosenfeld, M.G. & Glass, C.K. Transcriptional integration of TLR2 and TLR4 signaling at the NCoR derepression checkpoint. *Mol Cell* 35, 48-57 (2009).
56. Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A. & Evans, R.M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229 (1990).

57. Stopera, S.A. & Bird, R.P. Nuclear retinoic acid "orphan" receptors: progress towards an understanding of the new complexities in retinoid metabolism. *Progress in food & nutrition science* 15, 219-230 (1991).
58. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10, 940-954 (1996).
59. Kastner, P., Mark, M. & Chambon, P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869 (1995).
60. Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., *et al.* RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251-1266 (1991).
61. Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., *et al.* Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395 (1992).
62. Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S. & Evans, R.M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561 (1991).
63. Zhang, X.K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., *et al.* Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* 358, 587-591 (1992).
64. Vivat-Hannah, V., Bourguet, W., Gottardis, M. & Gronemeyer, H. Separation of retinoid X receptor homo- and heterodimerization functions. *Mol Cell Biol* 23, 7678-7688 (2003).
65. Ijpenberg, A., Tan, N.S., Gelman, L., Kersten, S., Seydoux, J., Xu, J., *et al.* In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 23, 2083-2091 (2004).
66. Levin, A.A., Sturzenbecker, L.J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., *et al.* 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355, 359-361 (1992).

67. Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., *et al.* 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406 (1992).
68. Kane, M.A. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* (2011).
69. Kane, M.A., Folias, A.E., Pingitore, A., Perri, M., Obrochta, K.M., Krois, C.R., *et al.* Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21884-21889 (2010).
70. Allenby, G., Bocquel, M.T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., *et al.* Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 30-34 (1993).
71. Klaholz, B.P., Renaud, J.P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., *et al.* Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat Struct Biol* 5, 199-202 (1998).
72. Mukherjee, R., Davies, P.J., Crombie, D.L., Bischoff, E.D., Cesario, R.M., Jow, L., *et al.* Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386, 407-410 (1997).
73. Mascrez, B., Mark, M., Dierich, A., Ghyselinck, N.B., Kastner, P. & Chambon, P. The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* 125, 4691-4707 (1998).
74. Lengqvist, J., Mata De Urquiza, A., Bergman, A.C., Willson, T.M., Sjovall, J., Perlmann, T., *et al.* Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 3, 692-703 (2004).
75. Gampe, R.T., Jr., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., *et al.* Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell* 5, 545-555 (2000).

76. Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR RXR Ligand-Binding Domains. *Molecular Cell* 5, 289-298 (2000).
77. Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. & Desvergne, B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* 280, 17880-17890 (2005).
78. Depoix, C., Delmotte, M.H., Formstecher, P. & Lefebvre, P. Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists. *J Biol Chem* 276, 9452-9459 (2001).
79. Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J. & Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 116, 417-429 (2004).
80. Willy, P.J. & Mangelsdorf, D.J. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 11, 289-298 (1997).
81. Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830 (2000).
82. Szeles, L., Poliska, S., Nagy, G., Szatmari, I., Szanto, A., Pap, A., *et al.* Research Resource: Transcriptome Profiling of Genes Regulated by RXR and Its Permissive and Nonpermissive Partners in Differentiating Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Mol Endocrinol* (2010).
83. Lefebvre, P., Benomar, Y. & Staels, B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol Metab* (2010).
84. Anderson, S.P., Dunn, C., Laughter, A., Yoon, L., Swanson, C., Stulnig, T.M., *et al.* Overlapping transcriptional programs regulated by the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha, retinoid X receptor, and liver X receptor in mouse liver. *Mol Pharmacol* 66, 1440-1452 (2004).

85. Lalloyer, F., Pedersen, T.A., Gross, B., Lestavel, S., Yous, S., Vallez, E., *et al.* Retinoid bexarotene modulates triglyceride but not cholesterol metabolism via gene-specific permissivity of the RXR/LXR heterodimer in the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1488-1495 (2009).
86. Vivat, V., Zechel, C., Wurtz, J.M., Bourguet, W., Kagechika, H., Umemiya, H., *et al.* A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J* 16, 5697-5709 (1997).
87. Zhang, J., Hu, X. & Lazar, M.A. A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol* 19, 6448-6457 (1999).
88. Germain, P., Iyer, J., Zechel, C. & Gronemeyer, H. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415, 187-192 (2002).
89. Sanchez-Martinez, R., Castillo, A.I., Steinmeyer, A. & Aranda, A. The retinoid X receptor ligand restores defective signalling by the vitamin D receptor. *EMBO Rep* 7, 1030-1034 (2006).
90. Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Noy, N. Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8645-8649 (1995).
91. Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Noy, N. Role of ligand in retinoid signaling. 9-cis-retinoic acid modulates the oligomeric state of the retinoid X receptor. *Biochemistry* 34, 13717-13721 (1995).
92. Kersten, S., Pan, L. & Noy, N. On the role of ligand in retinoid signaling: positive cooperativity in the interactions of 9-cis retinoic acid with tetramers of the retinoid X receptor. *Biochemistry* 34, 14263-14269 (1995).
93. Kersten, S., Gronemeyer, H. & Noy, N. The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J Biol Chem* 272, 12771-12777 (1997).
94. Kersten, S., Dong, D., Lee, W., Reczek, P.R. & Noy, N. Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J Mol Biol* 284, 21-32 (1998).

95. Gampe, R.T., Jr., Montana, V.G., Lambert, M.H., Wisely, G.B., Milburn, M.V. & Xu, H.E. Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix. *Genes Dev* 14, 2229-2241 (2000).
96. Egea, P.F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P.A. & Moras, D. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol* 307, 557-576 (2001).
97. Dong, D. & Noy, N. Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. *Biochemistry* 37, 10691-10700 (1998).
98. Nunez, V., Alameda, D., Rico, D., Mota, R., Gonzalo, P., Cedenilla, M., *et al.* Retinoid X receptor alpha controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10626-10631 (2010).
99. Meyer, M.B., Goetsch, P.D. & Pike, J.W. Genome-wide analysis of the VDR/RXR cistrome in osteoblast cells provides new mechanistic insight into the actions of the vitamin D hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 136-141 (2010).
100. Nielsen, R., Pedersen, T.A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., *et al.* Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22, 2953-2967 (2008).
101. Hamza, M.S., Pott, S., Vega, V.B., Thomsen, J.S., Kandhadayar, G.S., Ng, P.W., *et al.* De-novo identification of PPARgamma/RXR binding sites and direct targets during adipogenesis. *PLoS One* 4, e4907 (2009).
102. Boergesen, M., Pedersen, T.A., Gross, B., van Heeringen, S.J., Hagenbeek, D., Bindesboll, C., *et al.* Genome-wide profiling of liver X receptor, retinoid X receptor, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites. *Mol Cell Biol* 32, 852-867 (2012).
103. Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory

- elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 38, 576-589 (2010).
104. Dawson, M.I. & Xia, Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim Biophys Acta* 1821, 21-56 (2012).
 105. Altucci, L., Leibowitz, M.D., Ogilvie, K.M., de Lera, A.R. & Gronemeyer, H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 6, 793-810 (2007).
 106. Ishida, S., Shigemoto-Mogami, Y., Kagechika, H., Shudo, K., Ozawa, S., Sawada, J., *et al.* Clinically potential subclasses of retinoid synergists revealed by gene expression profiling. *Mol Cancer Ther* 2, 49-58 (2003).
 107. Orfanos, C.E., Zouboulis, C.C., Almond-Roesler, B. & Geilen, C.C. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs* 53, 358-388 (1997).
 108. Kizaki, M., Dawson, M.I., Heyman, R., Elster, E., Morosetti, R., Pakkala, S., *et al.* Effects of novel retinoid X receptor-selective ligands on myeloid leukemia differentiation and proliferation in vitro. *Blood* 87, 1977-1984 (1996).
 109. Kempf, W., Kettelhack, N., Duvic, M. & Burg, G. Topical and systemic retinoid therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 17, 1405-1419 (2003).
 110. Liby, K.T., Royce, D.B., Risingsong, R., Williams, C.R., Maitra, A., Hruban, R.H., *et al.* Synthetic triterpenoids prolong survival in a transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 1427-1434 (2010).
 111. Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., *et al.* Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193, 827-838 (2001).
 112. Claudel, T., Leibowitz, M.D., Fievet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J.J., *et al.* Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2610-2615 (2001).

113. Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I.P., Davies, P.J. & Nagy, L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2, S126-143 (2004).
114. Liu, S., Ogilvie, K.M., Klausning, K., Lawson, M.A., Jolley, D., Li, D., *et al.* Mechanism of selective retinoid X receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. *Endocrinology* 143, 2880-2885 (2002).
115. Haffner, C.D., Lenhard, J.M., Miller, A.B., McDougald, D.L., Dwornik, K., Ittoop, O.R., *et al.* Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha agonists. *J Med Chem* 47, 2010-2029 (2004).
116. Ogilvie, K.M., Saladin, R., Nagy, T.R., Urcan, M.S., Heyman, R.A. & Leibowitz, M.D. Activation of the retinoid X receptor suppresses appetite in the rat. *Endocrinology* 145, 565-573 (2004).
117. Li, X., Hansen, P.A., Xi, L., Chandraratna, R.A. & Burant, C.F. Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. *J Biol Chem* 280, 38317-38327 (2005).
118. Leibowitz, M.D., Ardecky, R.J., Boehm, M.F., Broderick, C.L., Carfagna, M.A., Crombie, D.L., *et al.* Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: potential benefits for the treatment of type 2 diabetes. *Endocrinology* 147, 1044-1053 (2006).
119. Forman, B.M. The antidiabetic agent LG100754 sensitizes cells to low concentrations of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *J Biol Chem* 277, 12503-12506 (2002).
120. Ahuja, H.S., Szanto, A., Nagy, L. & Davies, P.J. The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *J Biol Regul Homeost Agents* 17, 29-45 (2003).
121. Morita, K., Kawana, K., Sodeyama, M., Shimomura, I., Kagechika, H. & Makishima, M. Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and Nurr1. *Biochem Pharmacol* 71, 98-107 (2005).
122. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40, 845-859 (2004).

123. Shishido, S.N., Varahan, S., Yuan, K., Li, X. & Fleming, S.D. Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol* 144, 142-158 (2012).
124. Mackay, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101 (2001).
125. Olson, T.S. & Ley, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R7-28 (2002).
126. Hara, T., Bacon, K.B., Cho, L.C., Yoshimura, A., Morikawa, Y., Copeland, N.G., *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel member of the C-C chemokine family. *J Immunol* 155, 5352-5358 (1995).
127. Berahovich, R.D., Miao, Z., Wang, Y., Premack, B., Howard, M.C. & Schall, T.J. Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation. *J Immunol* 174, 7341-7351 (2005).
128. Poltorak, A.N., Bazzoni, F., Smirnova, I., Alejos, E., Thompson, P., Luheshi, G., *et al.* MIP-1 gamma: molecular cloning, expression, and biological activities of a novel CC chemokine that is constitutively secreted in vivo. *J Inflamm* 45, 207-219 (1995).
129. Hogaboam, C.M., Gallinat, C.S., Taub, D.D., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. & Lukacs, N.W. Immunomodulatory role of C10 chemokine in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Immunol* 162, 6071-6079 (1999).
130. Steinhäuser, M.L., Hogaboam, C.M., Matsukawa, A., Lukacs, N.W., Strieter, R.M. & Kunkel, S.L. Chemokine C10 promotes disease resolution and survival in an experimental model of bacterial sepsis. *Infect Immun* 68, 6108-6114 (2000).
131. LaFleur, A.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. & Matsukawa, A. Role of CC chemokine CCL6/C10 as a monocyte chemoattractant in a murine acute peritonitis. *Mediators Inflamm* 13, 349-355 (2004).
132. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852 (2002).
133. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435 (2008).

134. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006).
135. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826 (2007).
136. Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C. & Akira, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3, 352-363 (2008).
137. Beutler, B.A. TLRs and innate immunity. *Blood* 113, 1399-1407 (2009).
138. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182 (2006).
139. Rittirsch, D., Flierl, M.A. & Ward, P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776-787 (2008).
140. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145 (2001).
141. Cook, D.N., Pisetsky, D.S. & Schwartz, D.A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5, 975-979 (2004).
142. Frantz, S., Ertl, G. & Bauersachs, J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 4, 444-454 (2007).
143. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088 (1998).
144. Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M.G., *et al.* Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 23, 681-693 (2009).
145. Murray, P.J. & Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737 (2011).

146. Hashimoto, D., Miller, J. & Merad, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35, 323-335 (2011).
147. Mosser, D.M. & Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969 (2008).
148. Koh, T.J. & DiPietro, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e23 (2011).
149. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292 (1992).
150. Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., Jr. & Gause, W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 19, 448-453 (2007).
151. Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A. & Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229, 176-185 (2013).
152. Cvetanovic, M. & Ucker, D.S. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J Immunol* 172, 880-889 (2004).
153. Aderem, A. & Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623 (1999).
154. Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L. & Gregory, C.D. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509 (1998).
155. Schlegel, R.A., Krahling, S., Callahan, M.K. & Williamson, P. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ* 6, 583-592 (1999).
156. Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P. & Warner, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172, 1785-1794 (1990).

157. Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N. & Haslett, C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343, 170-173 (1990).
158. Platt, N., da Silva, R.P. & Gordon, S. Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett* 65, 15-19 (1999).
159. Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334 (2005).
160. Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., *et al.* C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194, 781-795 (2001).
161. Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., *et al.* Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 30022-30027 (1996).
162. Murray, P.J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8686-8691 (2005).
163. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y. & Henson, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898. (1998).
164. Charo, I.F. & Taubman, M.B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95, 858-866 (2004).
165. Hansson, G.K., Robertson, A.K. & Soderberg-Naucler, C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 1, 297-329 (2006).
166. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 717-727 (2006).

167. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118, 2992-3002 (2008).
168. Ruan, H. & Lodish, H.F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 447-455 (2003).
169. Barish, G.D., Downes, M., Alaynick, W.A., Yu, R.T., Ocampo, C.B., Bookout, A.L., *et al.* A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19, 2466-2477 (2005).
170. Valledor, A.F. & Ricote, M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 67, 201-212 (2004).
171. Ricote, M., Valledor, A.F. & Glass, C.K. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 230-239 (2004).
172. Roszer, T., Menendez-Gutierrez, M.P., Cedenilla, M. & Ricote, M. Retinoid X receptors in macrophage biology. *Trends Endocrinol Metab* (2013).
173. Mak, P.A., Laffitte, B.A., Desrumaux, C., Joseph, S.B., Curtiss, L.K., Mangelsdorf, D.J., *et al.* Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors α and β . *J Biol Chem* 277, 31900-31908 (2002).
174. Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., Palinski, W., Glass, C.K. Differential inhibition of macrophage foam cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . *J Clin Invest* 114, 1564-1576 (2004).
175. Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., *et al.* Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7604-7609. (2002).

176. Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., *et al.* Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* 151, 138-152 (2012).
177. Pascual, G., Ricote, M. & Hevener, A.L. Macrophage peroxisome proliferator activated receptor gamma as a therapeutic target to combat Type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 11, 1503-1520 (2007).
178. Mukundan, L., Odegaard, J.I., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mwangi, J.W., Ricardo-Gonzalez, R.R., *et al.* PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 15, 1266-1272 (2009).
179. N, A.G., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., *et al.* Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245-258 (2009).
180. Roszer, T., Menendez-Gutierrez, M.P., Lefterova, M.I., Alameda, D., Nunez, V., Lazar, M.A., *et al.* Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *J Immunol* 186, 621-631 (2011).
181. Sanchez-Martinez, R., Zambrano, A., Castillo, A.I. & Aranda, A. Vitamin D-dependent recruitment of corepressors to vitamin D/retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 28, 3817-3829 (2008).
182. Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A. & Mangelsdorf, D.J. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9, 1033-1045 (1995).
183. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. & Glass, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82 (1998).
184. Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., *et al.* 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4844-4849 (2000).

185. Kurokawa, R., Kalafus, D., Ogliastro, M.H., Kioussi, C., Xu, L., Torchia, J., *et al.* Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* 279, 700-703 (1998).
186. Huuskonen, J., Fielding, P.E. & Fielding, C.J. Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 703-708 (2004).
187. Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J.L., Metzger, D. & Chambon, P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14795-14800 (2005).
188. Hevener, A.L., Olefsky, J.M., Reichart, D., Nguyen, M.T., Bandyopadhyay, G., Leung, H.Y., *et al.* Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 117, 1658-1669 (2007).
189. Welch, J.S., Ricote, M., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J. & Glass, C.K. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6712-6717 (2003).
190. Ausubel, F.M. *Current protocols in molecular biology*, (J. Wiley, New York, 2001).
191. Ricote, M., Snyder, C.S., Leung, H.Y., Chen, J., Chien, K.R. & Glass, C.K. Normal hematopoiesis after conditional targeting of RXRalpha in murine hematopoietic stem/progenitor cells. *J Leukoc Biol* 80, 850-861 (2006).
192. Stender, J.D., Kim, K., Charn, T.H., Komm, B., Chang, K.C., Kraus, W.L., *et al.* Genome-wide analysis of estrogen receptor alpha DNA binding and tethering mechanisms identifies Runx1 as a novel tethering factor in receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 30, 3943-3955 (2010).
193. Escoubet-Lozach, L., Benner, C., Kaikkonen, M.U., Lozach, J., Heinz, S., Spann, N.J., *et al.* Mechanisms establishing TLR4-responsive activation states of inflammatory response genes. *PLoS Genet* 7, e1002401 (2011).

194. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. (2011).
195. Li, B. & Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323 (2011).
196. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140 (2010).
197. Langmead, B. & Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357-359 (2012).
198. Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211 (2001).
199. Matias-Roman, S., Galvez, B.G., Genis, L., Yanez-Mo, M., de la Rosa, G., Sanchez-Mateos, P., *et al.* Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood* 105, 3956-3964 (2005).
200. Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A. & Ward, P.A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4, 31-36 (2009).
201. Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Chang, J. & Lewis, A.J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions* 17, 197-204 (1985).
202. Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. & Fujikura, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132, 345-352 (1983).
203. De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J. & Young, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335-341 (1989).

204. Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R.K., Westin, S., *et al.* Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122, 707-721 (2005).
205. Temple, K.A., Cohen, R.N., Wondisford, S.R., Yu, C., Deplewski, D. & Wondisford, F.E. An intact DNA-binding domain is not required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) binding and activation on some PPAR response elements. *J Biol Chem* 280, 3529-3540 (2005).
206. Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., *et al.* Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 19, 6367-6378 (1999).
207. Schulman, I.G., Chakravarti, D., Juguilon, H., Romo, A. & Evans, R.M. Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8288-8292 (1995).
208. Kaikkonen, M.U., Spann, N.J., Heinz, S., Romanoski, C.E., Allison, K.A., Stender, J.D., *et al.* Remodeling of the Enhancer Landscape during Macrophage Activation Is Coupled to Enhancer Transcription. *Mol Cell* 51, 310-325 (2013).
209. Castrillo, A. & Tontonoz, P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 455-480 (2004).
210. Zhu, L., Bisgaier, C.L., Aviram, M. & Newton, R.S. 9-cis retinoic acid induces monocyte chemoattractant protein-1 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2105-2111 (1999).
211. Zhao, X., Sato, A., Dela Cruz, C.S., Linehan, M., Luegering, A., Kucharzik, T., *et al.* CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J Immunol* 171, 2797-2803 (2003).
212. Daynes, R.A. & Jones, D.C. Emerging roles of ppars in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2, 748-759 (2002).

213. Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., *et al.* Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400, 378-382 (1999).
214. Hotchkiss, R.S. & Karl, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348, 138-150 (2003).
215. Ma, B., Zhu, Z., Homer, R.J., Gerard, C., Strieter, R. & Elias, J.A. The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol* 172, 1872-1881 (2004).
216. Ness, T.L., Carpenter, K.J., Ewing, J.L., Gerard, C.J., Hogaboam, C.M. & Kunkel, S.L. CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis. *J Immunol* 173, 6938-6948 (2004).
217. Sarang, Z., Garabuczi, E., Joos, G., Kiss, B., Toth, K., Ruhl, R., *et al.* Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes. *Immunobiology* 218, 1354-1360 (2013).
218. Henson, P. Suppression of macrophage inflammatory responses by PPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6295-6296 (2003).
219. Jennewein, C., Kuhn, A.M., Schmidt, M.V., Meilladec-Jullig, V., von Knethen, A., Gonzalez, F.J., *et al.* Sumoylation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by apoptotic cells prevents lipopolysaccharide-induced NCoR removal from kappaB binding sites mediating transrepression of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 181, 5646-5652 (2008).
220. Savill, J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukocyte Biol.* 61, 375-380 (1997).
221. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6, 1191-1197 (2005).
222. Diab, A., Hussain, R.Z., Lovett-Racke, A.E., Chavis, J.A., Drew, P.D. & Racke, M.K. Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and the retinoid X receptor exert additive anti-inflammatory effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 148, 116-126 (2004).

223. Xu, J., Storer, P.D., Chavis, J.A., Racke, M.K. & Drew, P.D. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *J Neurosci Res* 81, 403-411 (2005).
224. Xu, J., Chavis, J.A., Racke, M.K. & Drew, P.D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol* 176, 95-105 (2006).
225. Zhang-Gandhi, C.X. & Drew, P.D. Liver X receptor and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol* 183, 50-59 (2007).
226. Boehm, M.F., Zhang, L., Badea, B.A., White, S.K., Mais, D.E., Berger, E., *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *J Med Chem* 37, 2930-2941 (1994).
227. Dzhagalov, I., Chambon, P. & He, Y.W. Regulation of CD8+ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor gamma. *J Immunol* 178, 2113-2121 (2007).
228. Mehta, K., McQueen, T., Tucker, S., Pandita, R. & Aggarwal, B.B. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 55, 336-342 (1994).
229. Wang, X., Allen, C. & Ballow, M. Retinoic acid enhances the production of IL-10 while reducing the synthesis of IL-12 and TNF-alpha from LPS-stimulated monocytes/macrophages. *J Clin Immunol* 27, 193-200 (2007).
230. Ricote, M. & Glass, C.K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771, 926-935 (2007).
231. Pascual-Garcia, M. & Valledor, A.F. Biological roles of liver X receptors in immune cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 60, 235-249 (2012).
232. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A.R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-28245 (2000).
233. Schulman, I.G., Shao, G. & Heyman, R.A. Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)

heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol* 18, 3483-3494 (1998).

234. Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P. & Evans, R.M. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7, 48-52 (2001).

8. ANEXO

I. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los experimentos

Tabla 1

Gen	Directo	Reverso
hRXR-AEE	GAGCAGCGGGGAGGCGGAGAGCTCGAGCTCCGCCCTGCCGGC	GCCGGCAGGGGAGCTGAGCTTCTCGGCCCTCCCGGCTGCTC
hRXRY402A	CTGAGGGAGAGGTGCGTGGCTCTTGGAGGC	GCCTCAAGGAGCGCAGCAGCTTCTCCCTCAG
hRXR-DBDmut	GGAGTGTACAGCTCGGGAGCTGCAAGGGCTTCTTCA	TGAAGAGCCCTTGCAGCTCCGCGAGCTGTACACTCC
hPPAR γ -AFE	CCACCTTGATCCTCACAGCTGGCTTCAAGCTGAGCAGAAAAATGACAGACCTCAGAC	GTCTGAGGCTGTCAATTTCTGCTCCAGCTTGAAGCCAGCTGTGAGGACTCAGGGTGG
hPPAR γ -R397C	TTATTTCTAGTGAGACTGCCAGCTTTCCTGAAT	ATTCAAGAAACCTGGGAGTCTCCCACTGAGAAATAA
Ccl6mut	GCATTCAGAACACTACCATGGCACTTC	GGAAGTGCCATGGTAGTGTCTGAATGC
Ccl9mut	GGGCATTAAAGCAGTACCCCAAGGG	CCCTTGGGTACTGCTCTTAATGCC

Tabla 2

Gen	Directo	Reverso
36b4	GCGACCTGGAAGTCCAACTA	ATCTGCTGCATCTGCTTGG
Abcg1	TCACCCAGTTCTGCATCCTCTT	GCAGATGTGACGACCGAGT
Adrp	CCAGCCAAAGTCCGAGATT	TGGTAGTGTACACCATCCTT
Axl	GTCAGAGGAATCGGCTGAAA	GGCAGAGCCTTCAGTGTGT
C1qa	CCGGGTCTCAAAGGAGAGAG	AGATTCCCTGGGTCTCT
C1qb	CAGGATAAAGGGGGAGAAA	GGACCTTAGGGCCAACTT
C1qc	GGACGGGATGATGGACT	CCTGGCAACCTGAGGTC
Ccl17	TGCTTCTGGGACTTTTCTG	CATCCCTGGAACACTCCACT
Ccl6	GGAGGAGTGAGCAAAATTC	GCAGAGTCTCTTTTCCA
Ccl9	TGTAGTCAAGGAGGGCAIT	CTTCAGACTGCTTGTCTTTC
Ccr1	GTTGGACCTTGAACCTTGA	CCAAAGCTCTTACAGCAG
Cd36	GAGCAACTGTGTGATGTTT	GCAGAAATCAAGGAGAGCAC
Csf2	ATGCCTGTACGTTGAATGA	CCGTAGACCTGCTCGAATA
Fcgr1	GGCAGGAAGATCCTGGAGTA	TGAAACAGACAGGAGCTGA
IL10	TGAATTCCTGGTGAGAG	TCACCTTCACTGCTCCACT
IL12b	ATCAGCGCAAGAAAGAAA	AATAGGATCCTGAGCTTGC
IL19	GCCCCCTTGTAGACTTCACG	AACCTGCTGGGTGACCAT
IL1b	GCAACTGTCTGAACCTCAACT	ATCTTTGGGTCCGTCACCT
Mertk	GACTCCCTATCCCGGAGTTC	CTGCAGCTCAACACAGAGA
Mrc1	ATGCCAAGTGGGAAAATCTG	TGTAGAGTGGCCTGTCATAG
Nos2	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
Pdpn	GAGGAAGTGTCCACCTCAGC	ATGGCTAACAGAGCCCAAC
Serpin2b	CCATAGTCTCTCGGTGCT	TCTCCTGCTTGTGCTGTAA
Slam	TCAAGCTATCATCGCAAGCA	CCGTGAAAACCAAGGATGAAG
Tgfr1	GCTAATGGTGGACCGCAAC	CGAATGTCTGACGTATTGAAGAA
Tgm2	GTGTGCTCTCTGCTGTG	GATCGAAGTGGGATGCTGT
Tnf	CCAGACCCCTCACACTCAGATC	CACCTTGGTGGTTTGTACGAC

Tabla 3

Gen	Directo	Reverso
Ccl6	CCAGGGACAGCAITCTGAACCTACCCCTGGCAGCTTCTCTGAACC	GGTTCAGGAAGTGCACGGGTAGAGTTTCAAGATGCTGTCCCTGG
Ccl9	CAAGGAGGGCATATGAGCTGATCCCCAGGGACTTCTCTGATCC	GGATCAGGAAGTCCCTGGGTACAGCTCATAATGCCCTCCTTIG
Ccl6mut	CCAGGGACAGCAITCAGAACACTACCATGGCAGCTTCTCTGAACC	GGTTCAGGAAGTGGCATGGTAGTGTCTGAATGCTGTCCCTGG
Ccl9mut	CAAGGAGGGCATTAAGAGCAGTACCCAGGGAGCTTCTCTGATCC	GGATCAGGAAGTCCCTTGGGTACIGCTCTTAATGCCCTCCTTIG

II. Fórmulas de los tampones empleados en los experimentos de ChIP

Cell Buffer Mix	Final
HEPES/KOH, pH 7.9	10 mM
KCl	85 mM
EDTA	1 mM

*Para preparar L1A (900 μ L CBM + 100 μ L ddH₂O), L1B (900 μ L CBM + 100 μ L 10%NP-40)

Buffer RIPA	Final
Tris/HCl, pH 7.6	10 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
SDS	0.10%
NaDOC	0.50%
NP-40	1%
NaCl	150 mM

Buffer de lavado LiCl	Final
Tris/HCl, pH 7.4	100 mM
LiCl	500 mM
NP-40	1%
NaDOC	1%
EDTA, pH 8.0	1 mM

Buffer de elución	Final
NaHCO ₃	0.1 M
SDS	1%

TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

ANEXO:

III. Publicaciones

